



**Raquel Alexandra
Reis Lisboa**

Morfologia dos gâmetas, fertilização *in vitro*, divisão celular e formação de pólipos de *Catostylus tagi* (Cnidaria: Catostylidae)

Declaração

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos académicos.



**Raquel Alexandra
Reis Lisboa**

Morfologia dos gâmetas, fertilização *in vitro*, divisão celular e formação de pólipos de *Catostylus tagi* (Cnidaria: Catostylidae)

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica da Doutora Zilda Morais, docente da Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior, e a co-orientação do Doutor Ricardo Calado, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Dedicatória

À minha mãe e irmã por demonstrarem que a família é a base do amor, aconchego e porto de abrigo.

O júri

presidente

Doutora Ana Isabel Lillebo Batista
Investigadora Principal em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

Doutor Sérgio Miguel Franco Martins Leandro
Professor adjunto, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar- Instituto
Politécnico de Leiria

Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado
Investigador Principal em Regime Laboral, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda e o apoio de um conjunto de pessoas a quem devo o meu mais profundo agradecimento.

Destaco assim,

A minha orientadora, Professora Zilda Morais, pelo entusiasmo com que aceitou orientar este trabalho, mesmo sabendo as possíveis dificuldades. Um muito obrigado por toda a ajuda, apoio incondicional, pela partilha de ideias, incentivo constante e pelas valiosas sugestões.

O meu co-orientador Doutor Ricardo Calado, pelo seu incentivo, pela sua receptividade e igualmente pelo seu apoio na elaboração deste trabalho.

O Professor José Martins dos Santos, Presidente da Cooperativa Egas Moniz, falecido em 2016, e o Professor José João Mendes, atual presidente, por compreenderem a inter-relação entre a biologia marinha e a saúde humana e apoiarem esta investigação.

O Professor André Morandini da Universidade de São Paulo, o Professor Paulo Mascarenhas da Cooperativa Egas Moniz e a Dr.^a Fátima Gil, do Aquário Vasco da Gama, pelo incansável apoio moral, orientação, disponibilidade e ajuda que permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução e sucesso desta tese.

Os Srs. Olímpio Simões e Vítor Reis, pela disponibilidade e amabilidade na recolha das nossas amostras.

O Doutor Francisco Ruano, do Laboratório de Patologia do IPMA e a Professora Carina Ladeira, da ESTSL, pelo suporte logístico na realização dos ensaios histológicos

A Doutora Isabel Nogueira, do Laboratório de Microscopia Eletrónica do IST/UL, pelas excelentes imagens de microscopia eletrónica de varrimento.

O Dr. David Silva da Leica pela boa vontade em providenciar a lupa com câmara acoplada.

As minhas colegas do projeto *C. tagi* e do laboratório 303, Rita Rodrigues e Rita Reis, pelo convívio e amizade.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a toda a minha família, amigos e namorado, especialmente à minha mãe e à minha irmã pelo apoio incondicional.

Resumo

O cifozeário *Catostylus tagi*, nativo dos estuários do Tejo e Sado, tem sido estudado para aplicações na área da farmacêutica e da nutrição desde 2004. Contudo, até à data do presente estudo, não existem dados disponíveis sobre a biologia de *C. tagi* e é cada vez mais importante conhecer o ciclo de vida desta espécie para que a sua reprodução em laboratório seja possível, de forma a poder investigá-lo em condições controladas e sem estar dependente da sazonalidade do seu ciclo de vida. No presente trabalho iniciou-se a caracterização do sistema reprodutivo de *C. tagi* e a determinação das condições de fertilização *in vitro* e de manutenção dos pólipos recém-formados.

Nos verões de 2016 e 2017, foram recolhidos 100 exemplares de *C. tagi* no estágio medusa. Em laboratório, numa primeira fase, foram realizadas análises microscópicas, análises histológicas e citoquímicas às gónadas. Por último, foi realizado o processo de fertilização *in vitro*. Os ovócitos amostrados apresentaram diâmetros de 11 a 60 µm enquanto a dimensão mais alongada dos folículos espermáticos variou entre 11 e 50 µm. Não foi encontrado qualquer tipo de dimorfismo sexual, apenas sendo possível através de microscópio ótico realizar diferenciações confiáveis. Os estudos citoquímicos preliminares dos ovócitos e folículos espermáticos não indicaram a incorporação de mucinas ou cálcio na membrana exterior, contrariamente ao já verificado nos nematocistos de *C. tagi*. Importa igualmente salientar que não foram observadas zonas preferenciais de localização de lípidos. Após a fertilização *in vitro* foi possível registar as fases iniciais da divisão celular de *C. tagi* e observar a formação de um pólipo com 4 tentáculos em estado avançado. Observou-se que a sobrevivência dos pólipos pode estar dependente da presença de substrato e de condições adequadas de temperatura e salinidade. Investigações adicionais sobre o estágio medusa são igualmente necessárias para entender o crescente sucesso reprodutivo deste cifozeário em águas nacionais. Para além disso, os resultados alcançados revelam que os estágios iniciais de

desenvolvimento no ciclo de vida, as plânulas e os pólipos, podem ter um papel fundamental no aparecimento de *blooms* desta espécie.

palavras-chave

Catostylus tagi, gametogénese, fertilização *in vitro*, ciclo de vida, estuário do Tejo.

Abstract

The scyphozoan *Catostylus tagi*, native of the Tagus and Sado estuaries, has been studied for pharmaceutical and nutritional applications since 2004. However, as of this study, there are no data available on the biology of *C. tagi* and it is increasingly important to know the life cycle of this species so that it is possible to reproduce this organism in the laboratory, in order to be able to investigate it under controlled conditions and without being dependent on the seasonality of its life cycle. In this work the characterization of the reproductive system of *C. tagi* was started, along with the determination of in vitro fertilization conditions and maintenance of newly formed polyps.

In the summer of 2016 and 2017, 100 specimens of *C. tagi* were collected at jellyfish stage. In the laboratory, in a first phase, microscopic analyses, histological and cytochemical analysis were performed on its gonads. Lastly, the in vitro fertilization process was also carried out. Sampled oocytes displayed diameters ranging from 11 to 60 μm , while the more elongated dimension of the spermatid follicles varied between 11 to 50 μm . No type of sexual dimorphism was recorded, with any reliable differentiations only being made possible through the use of an optical microscope. The preliminary cytochemical studies performed on oocytes and spermatid follicles did not indicate the incorporation of mucins or calcium in the outer membrane, in contrast to the findings already recorded for the nematocysts of *C. tagi*. It should also be noted that preference areas for lipid localization have not been observed. Following *in vitro* fertilization, it was possible to record the initial phases of the cellular division of *C. tagi* and observe the formation of a polyp with 4 tentacles in advanced state. It was also observed that polyps' survival may be dependent on the presence of an adequate substrate and suitable conditions of temperature and salinity. Further research on the jellyfish stage is also needed to understand the increasing reproductive success of this scyphozoan in national waters. In addition, the present results demonstrate that the initial stages of development in the life cycle of this species, the

planulae and the polyps, can play a key-role in the appearance of blooms of *C. tagi*.

keywords

Catostylus tagi, gametogenesis, *in vitro* fertilization, life cycle, Tagus estuary.

Índice geral

Dedicatória	I
O júri	II
Agradecimentos	III
Resumo	I
Abstract	III
Índice geral	V
Índice de figuras	VII
Índice de tabelas.....	IX
1. Introdução	- 1 -
1.1. Zooplâncton gelatinoso e a sua importância	- 1 -
1.2. Cífozoários: Morfologia e ciclo de vida	- 3 -
1.3. <i>Catostylus tagi</i> : Espécie de estudo.....	- 7 -
1.4. Objetivo do presente trabalho.....	- 10 -
2. Materiais e Métodos	- 11 -
2.1. Caracterização da área de estudo e amostragem do material biológico.....	- 11 -
2.2. Observações das gónadas	- 13 -
2.2.1. Medições dos gametas	- 13 -
2.2.2. Ensaios histológicos	- 14 -
2.2.3. Microscopia eletrónica de varrimento, SEM	- 15 -
2.3. Procedimentos de fertilização <i>in vitro</i>	- 15 -
2.4. Observações e procedimentos para a sobrevivência dos pólipos	- 17 -
2.5. Análise estatística.....	- 17 -
3. Resultados	- 18 -
3.1. Morfologia das gónadas femininas e masculinas.....	- 18 -
3.2. Estudos preliminares sobre a histoquímica e a citoquímica das gónadas	- 21 -
3.3. Estádios de gametogénese, ovogénese e espermatogénese	- 22 -
3.4. Observações por microscopia eletrónica de varrimento, SEM	- 27 -
3.5. Ensaios de fertilização <i>in vitro</i>	- 27 -
3.6. Estudos preliminares sobre a sobrevivência dos pólipos.....	- 31 -
4. Discussão	- 35 -
4.1. Morfologia das gónadas femininas e masculinas.....	- 35 -
4.2. Estudos preliminares sobre a histoquímica e a citoquímica das gónadas	- 36 -
4.3. Estádios de gametogénese, ovogénese e espermatogénese	- 36 -
4.4. Observações por microscopia eletrónica de varrimento, SEM	- 38 -
4.5. Ensaios de fertilização <i>in vitro</i>	- 38 -

4.6. Estudos preliminares sobre a sobrevivência dos pólipos.....	- 40 -
5. Considerações finais	- 42 -
6. Bibliografia.....	- 44 -
Anexos	X
<i>Anexo 1- Preparação das soluções:.....</i>	<i>X</i>
<i>Anexo 2- Observações adicionais</i>	<i>X</i>
<i>Anexo 3- Publicações associadas a este trabalho</i>	<i>XIII</i>

Índice de figuras

Figura 1- Exemplo de morfologia de medusa, <i>Aurelia aurita</i> . (A) Vista lateral; (B) Vista oral (Fox, 2006).- 4 -	-
Figura 2- Gónadas de <i>Catostylus tagi</i> (foto por Raquel Lisboa).- 4 -	
Figura 3- Exemplo de ciclo de vida de cifozoário, <i>Stomolophus meleagris</i> (Arai, 2012).- 6 -	
Figura 4- (I) Padrão dos canais da subumbela do género <i>Catostylus</i> (Stiasny, 1922); (II) Padrão dos canais da subumbela de um exemplar de <i>C. tagi</i> , corado por A. Morandini (foto por Raquel Lisboa, 2017); (III) Umbela de <i>C. tagi</i> corada seletivamente com azul-de-metileno por A. Morandini (foto por Raquel Lisboa, 2017). - 8 -	
Figura 5- Cladograma baseado no 18S rDNA de <i>Catostylus tagi</i> , <i>Lychnorhiza lucerna</i> , <i>Catostylus mosaicus</i> , <i>Rhopilema esculentum</i> , <i>Cyanea capillata</i> e <i>Hydra magnipapillata</i> (Parracho, 2013).- 8 -	
Figura 6- Zona de recolha de medusas <i>Catostylus tagi</i>- 11 -	
Figura 7- (A) Técnica utilizada na recolha das amostras de <i>Catostylus tagi</i> ; (B) Exemplar de <i>Catostylus tagi</i> individualizado pela metodologia de marcação numérica da subumbela com furos uniformes, indicando ser o décimo organismo recolhido.- 12 -	
Figura 8- Armazenamento das amostras de <i>Catostylus tagi</i> . (A) Medusas inteiras em conjunto num reservatório; (B) Umbelas individualizadas em suportes.- 13 -	
Figura 9- Amostras de <i>Catostylus tagi</i> recolhidas em 2016.- 14 -	
Figura 10- Equipamento de microscopia electrónica, IST/UL. (A) Visão geral do SEM; (B) Visão compartimento de amostra.- 15 -	
Figura 11- Esquema do processo de fertilização <i>in vitro</i> a partir dos espécimes recolhidos.- 16 -	
Figura 12- Acompanhamento da sobrevivência dos pólipos de <i>Catostylus tagi</i> , em lupa S9i.- 17 -	
Figura 13- Exemplar típico de medusa <i>Catostylus tagi</i> recolhido no Tejo.- 18 -	
Figura 14- Gónadas de <i>Catostylus tagi</i> . (A) Gónada feminina fresca, barra de escala 10 cm; (B) Gónada masculina fresca, barra de escala 10 cm; (C) Ovócitos em formaldeído, barra de escala 30 µm; (D) Folículos espermáticos em formaldeído, barra de escala 20 µm; (E) Ovócitos com coloração hematoxilina-eosina, barra de escala 10 µm; (F) Folículos espermáticos com coloração hematoxilina-eosina, barra de escala 10 µm. As barras em (E) e (F) indicam o modo de medição dos comprimentos.- 19 -	
Figura 15- Gónadas femininas e masculinas de <i>Catostylus tagi</i> . F16 e F17: diâmetro dos ovócitos em Setembro 2016 (n=95) e Junho-Julho 2017 (n=40), respetivamente. M16 e M17: comprimento dos folículos espermáticos em Setembro 2016 (n=305) e Junho-Julho 2017 (n = 110), respetivamente.- 20 -	
Figura 16- Coloração histoquímica das gónadas de <i>Catostylus tagi</i> com os corantes azul ciano, negro Sudão, e Von Kossa. (A) Gónadas de fêmea coradas com azul ciano; (B) Gónadas de macho coradas com azul ciano; (C) Gónadas de fêmea coradas com negro Sudão; (D) Gónadas de macho coradas com negro Sudão; (E) Gónadas de fêmea coradas com Von Kossa; (F) Gónadas de macho coradas com Von Kossa. As setas destacam o resultado de cada coloração. Escala indicada na figura.- 22 -	
Figura 17- Corte histológico de gónada feminina de <i>Catostylus tagi</i> com ovócitos em diferentes estádios. (A) 100x; (B) 400x; (C) 1000x. (N) Núcleo; (Op) Ooplasma; (PV) Pré-vitelogénese; (Tr) Trofócito; (VA) Vitelogénese avançada; (VI) Vitelogénese inicial; (VM) Vitelogénese intermédia. Coloração hematoxilina-eosina. Escalas indicadas nas figuras.- 24 -	
Figura 18- Corte histológico de gónada masculina de <i>Catostylus tagi</i> com diferentes estádios de espermatogénese. (A) 100x; (B) 400x; (C) 1000x. (EC) Espermátócitos; (EG) Espermátogónios; (ET)	

Espermatídios; (EZ) Espermatozoides; (FE) Folículo espermático. Coloração hematoxilina-eosina. Escalas indicadas nas figuras.	- 26 -
Figura 19- Observações SEM das gónadas de <i>Catostylus tagi</i> . (A) Ovócitos intactos; (B) Folículos espermáticos intactos.	- 27 -
Figura 20- Cronologia das etapas de evolução do ovo fecundado de <i>Catostylus tagi</i>	- 28 -
Figura 21- Observações a fresco das divisões celulares resultantes da fertilização <i>in vitro</i> de <i>Catostylus tagi</i> . (A) Ovo fecundado com presença de corpos polares; (B) Início da divisão celular; (C) Divisão em 2 células; (D) Divisão em 4 células; (E) Divisão em 8 células; (F) Divisão em ~ 64 células. Escalas indicadas nas figuras.	- 29 -
Figura 22- Observações a fresco dos organismos resultantes da fertilização <i>in vitro</i> de <i>Catostylus tagi</i> . (A) Plânula; (B) Plânula em estado avançado; (C) Pólipo recém-assentado. Escalas indicadas nas figuras.	- 30 -
Figura 23- Observações a fresco dos estádios de maturação do pólipo de <i>Catostylus tagi</i>	- 31 -
Figura 24- Acompanhamento da sobrevivência dos pólipos de <i>Catostylus tagi</i> . (I) Resultados globais; (II) Resultados por frasco; (III) Resultados segundo a presença de substrato.	- 33 -
Figura 25- Observação a fresco de pólipo de <i>Catostylus tagi</i> após 7 dias de assentamento, barra de escala 500 µm (foto por Raquel Lisboa).	- 34 -
Figura 26- Observações SEM das gónadas <i>C. tagi</i> . (A) Ovócito danificado; (B) Ovócito com crustáceo não identificado; (C) Folículo espermático com cnidário não identificado (fotomicrografias I. Nogueira).	X
Figura 27- Observações <i>in situ</i> de organismos com relações ecológicas a <i>C. tagi</i> . (A) Carapau, <i>Trachurus trachurus</i> ; (B) Crustáceo, identificação em andamento.	XI
Figura 28- Crustáceo recolhido da gónada de <i>C. tagi</i> , em observação no laboratório da Egas Moniz, (A) Vista macroscópica; (B) Vista com a lupa Si9.	XII

Índice de tabelas

Tabela 1- Classificação dos cnidários em 2018 (Kayal et al., 2017; adaptado Costello, Bouchet, Emblow & Legakis, 2006).	- 2 -
Tabela 2- Similaridade entre as medusas <i>Catostylus tagi</i> do Tejo e do Sado e da sequência de consenso com <i>Catostylus mosaicus</i> , nas regiões estudadas (adaptado de Parracho, 2013).	- 7 -
Tabela 3- Características gerais do estuário do Tejo (Cabral e Costa, 1999; Caçador, 2011).	- 11 -
Tabela 4- Número de exemplares de <i>Catostylus tagi</i> recolhidos ao longo do estudo e sua utilização.	- 12 -
Tabela 5- Sexo, cor e diâmetro da umbela de exemplares de <i>Catostylus tagi</i> recolhidos em 2016 e 2017.-	- 21 -
Tabela 6- Caracterização e duração das etapas da evolução do ovo fecundado de <i>Catostylus tagi</i>	- 28 -
Tabela 7- Dados de sobrevivência dos pólipos de <i>Catostylus tagi</i> ao longo dos primeiros 8 dias de assentamento.	- 32 -

1. Introdução

1.1. Zooplâncton gelatinoso e a sua importância

O zooplâncton gelatinoso é composto por representantes de vários filos de invertebrados marinhos caracterizados pela sua transparência e fragilidade, bem como pela elevada percentagem de água apresentada pelos seus tecidos (> 90%). Estes organismos apresentam um estágio do seu ciclo de vida planctónico (vivendo na coluna de água) sendo constituídos por um corpo gelatinoso (Diaz Briz *et al.*, 2017). De entre estes organismos pertencentes ao zooplâncton gelatinoso destacam-se os membros do filo Cnidaria (classes Scyphozoa, Cubozoa, Hydrozoa e Staurozoa), Ctenophora (classes Nuda e Tentaculata) e o filo Chordata (classes Appendicularia e Thaliacea). (Raskoff *et al.*, 2003).

Os cnidários são considerados como organismos-chave em vários campos de pesquisa, desde a evolução até a ecologia, devido à elevada diversidade morfológica e de ciclos de vida que evidenciam. Para além disso, estão ligados geneticamente ao grupo Bilateria, sendo possível assim estudar o desenvolvimento, a formação de padrões, a regeneração e a biologia celular deste grupo como modelo para compreensão destas questões em organismos "superiores". (Grawunder *et al.*, 2015).

Em 2018, ficou estabelecido que o filo Cnidaria é composto por 8 classes (Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Polypodiozoa, Scyphozoa, Staurozoa, Myxozoa), tal como referido no World Register of Marine Species ("WoRMS"). As diferentes classes do filo Cnidaria estão atualmente subdivididas nas subclasses e ordens referidas na tabela 1.

Tabela 1- Classificação dos cnidários em 2018 (Kayal et al., 2017; adaptado Costello, Bouchet, Emblow & Legakis, 2006).

Domínios	Eukarya				Bacteria	Archaea
Reinos	Animalia	Plantae	Protista	Fungi	Bacteria	Archaea
Filo	Cnidaria					
Classe	Sub classe	Ordem				
Anthozoa	Ceriantharia	Penicillaria; Spirularia				
	Hexacorallia	Actiniaria; Corallimorpharia; Scleractinia; Zoantharia				
	Octocorallia	Alcyonacea; Helioporacea; Pennatulacea; Octocorallia incertae sedis				
Cubozoa	-	Carybdeida; Chiropsopida				
Hydrozoa	Hydroidolina	Anthoathecata; Leptothecata; Siphonophorae				
	Trachylinae	Actinulida; Limnomedusae; Narcomedusae; Trachymedusae				
Polypodiozoa	-	Polypodiidea				
Scyphozoa	Coronamedusae	Coronatae				
	Discomedusae	Rhizostomeae; Semaestomeae				
Staurozoa	-	Stauromedusae				
Myxozoa	Malacosporea	-				
	Myxosporea	Bivalvulida; Multivalvulida				

São uma componente notável das comunidades planctônicas e representam uma parte da biota aquática que é de elevada importância para o funcionamento da biosfera em termos de produção primária e secundária. Efetivamente, estes organismos não são apenas predadores importantes (de larvas e ovos de peixes) e competidores (comendo a mesma presa de alguns peixes) nas cadeias alimentares marinhas, são igualmente importantes como presas para uma variedade de predadores marinhos, incluindo tartarugas, pássaros, peixes e outros organismos gelatinosos (Pitt *et al.*, 2014).

Estes organismos têm a capacidade de formar grandes agregações (Graham *et al.*, 2014), o que pode impactar negativamente o turismo, a saúde, a aquicultura e a pesca (Doyle *et al.*, 2008). Para além disso, têm igualmente impacto na cadeia alimentar em vários níveis sendo por isso, necessário realizar um trabalho quantitativo adicional sobre as interações de organismos gelatinosos com peixes e outros grupos marinhos para avaliar a sua posição trófica e importância em ecossistemas pelágicos (Aubert *et al.*, 2018).

Vários fatores antropogénicos, tais como a sobrepesca, a eutrofização e as alterações climáticas globais, têm sido consideradas como possíveis causas para o aumento das populações de organismos gelatinosos (Arai, 2009; Mills, 2001; Pitt *et al.*, 2014; Pradeu, 2011). Nesse contexto, é importante explorar a ecologia trófica dos cnidários para conhecer os potenciais predadores e a frequência com que estes organismos são consumidos e assim permitir o planeamento, gestão e o estudo de pescas em áreas específicas (Richardson *et al.*, 2009). No entanto, estes organismos não

representam apenas impactos negativos do ponto de vista económico, uma vez que as medusas possuem um papel importante no comércio asiático como alimento (Graham *et al.*, 2014). Adicionalmente, foram já realizados avanços médicos relevantes usando alguns componentes derivados destes organismos, tal como o colagénio e a quiumucina, e foram igualmente descobertas novas aplicações biotecnológicas, tais como o potencial uso do muco destes organismos para a despoluição de nanopartículas (Patwa *et al.*, 2015). Os cnidários também desempenham um papel ecológico fundamental no ecossistema marinho: representam um importante fornecimento de alimentos para as principais espécies de peixes e podem transferir nutrientes para a comunidade bentónica através da sua própria decomposição, particularmente após um *bloom* da população (Cardona *et al.*, 2012; Sweetman & Chapman, 2015), também podem fornecer refúgios para pequenos peixes, evitando assim a sua predação por espécies maiores (Aubert *et al.*, 2018). Quer tenham um impacto negativo ou positivo sobre os ecossistemas marinhos e os serviços que eles fornecem, os cnidários devem ser alvo de estudos que contemplem a sua e monitorização, gestão e valorização (Aubert *et al.*, 2018).

Os cnidários já são uma indústria multimilionária na economia global, tendo sido pesquisadas técnicas para produzir cifofoários comestíveis a grande escala (Khong *et al.*, 2016). Os cifofoários podem ser uma boa escolha para fins aquícolas, uma vez que algumas das espécies podem ser encontradas durante todo o ano e mesmo aquelas que são sazonais podem ser produzidas em cativeiro e têm várias utilizações devido às suas características (Scanes, 2018). Por exemplo, nutricionalmente possuem baixo teor de calorias e gordura e alto teor de água e proteína (Khong *et al.*, 2016).

1.2. Cifofoários: Morfologia e ciclo de vida

Os cifofoários no estágio medusa são constituídos por 97% de água e caracterizados por uma anatomia relativamente simples, consistindo em duas camadas de células, a ectoderme (camada exterior) e a endoderme (camada interior) separadas por uma substância gelatinosa, a mesoglea (Arai, 2012).

A figura 1 ilustra a morfologia e a nomenclatura dos vários constituintes da medusa *Aurelia aurita*, o mais cosmopolita dos cifofoários. A maioria das medusas apresenta principalmente simetria radial, com uma estrutura em forma de sino (umbela). A superfície exterior da umbela é usualmente convexa e denomina-se de exumbela, enquanto a superfície interior (subumbela) é côncava e delimita a cavidade gastrovascular interna (coelenteron). O coelenteron funciona como estômago e intestino com uma abertura para a boca e o ânus, facilitando a digestão e distribuição de comida.

A subumbela possui uma extensão numa estrutura chamada de manúbrio, que contém a cavidade gástrica, e a boca apresenta-se suspensa no fim ou no centro desta estrutura. Perto da boca estão localizados os braços orais (de quatro a oito) e são utilizados para transportar o alimento que foi capturado (Arai, 2012).

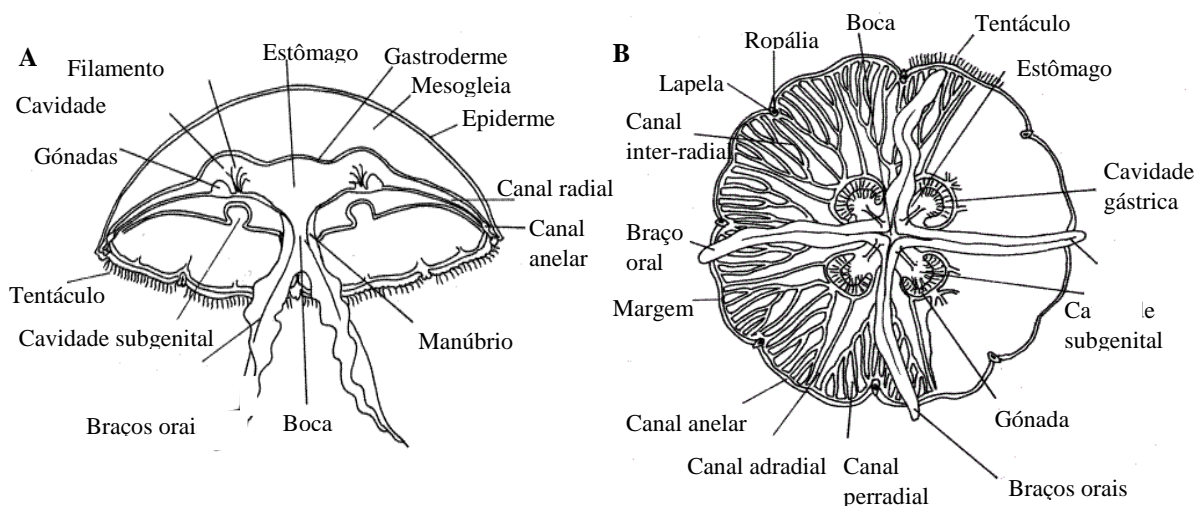


Figura 1- Exemplo de morfologia de medusa, *Aurelia aurita*. (A) Vista lateral; (B) Vista oral (Fox, 2006).

A umbela possui na margem a ropália, em que estão distribuídos órgãos simples, tais como, estatocisto (concede equilíbrio), ocelli (detetores de luz) e “lapelas” (recetores de contacto). Para além disso, estes organismos possuem um sistema nervoso (sináptico) básico, mas eficiente constituído por recetores capazes de detetar luz, odor e outros estímulos. (Hamner, 1995).

Quando o organismo se movimenta para uma certa direção, os estatocistos fazem pressão nos cílios, ativando as células nervosas. Este mecanismo permite que o organismo esteja informado da sua orientação e pode alterar a direção a partir de contrações de um lado da umbela (Arai, 2012).

No que respeita às gónadas, estas surgem a partir da gastroderme, e usualmente situam-se na parte inferior da cavidade gastrovascular periférica para o cirro gástrico (Figura 1B). À medida que as bolsas gástricas crescem, o desenvolvimento inicial começa pela migração de células do endoderma gástrico para a mesogleia, formando as gónadas (Figura 2). As gónadas desenvolvidas situam-se em forma de cruz e no centro existem canais de mesoglea. Cada secção da cruz é uma evaginação no interior da bolsa gástrica, formando uma dobra. No interior desta dobra estão prolongamentos do epitélio (cirro gástrico), enquanto, no exterior estão as células reprodutoras (Arai, 2012; Schiariti *et al.*, 2012).



Figura 2- Gónadas de *Catostylus tagi* (foto por Raquel Lisboa).

A maioria dos cifozoários são gonocóricos, ou seja, têm os sexos separados, o que faz com que exista ovogénese nas fêmeas e espermatogénese nos machos. Nas fêmeas, as células que se desenvolverão como óvulos surgirão do epitélio gastrodermal do ovário. À medida que os ovócitos crescem, vão aglomerando gradualmente na mesoglea da gónada, mas mantêm contato com células especializadas no epitélio, os trofócitos. Nos machos, os espermatozoides, como os de *A. aurita* e *Catostylus mosaicus* desenvolvem-se em folículos formados pela invaginação do epitélio na mesoglea do testículo. A cavidade do folículo está aberta para a cavidade gastrovascular e os espermatócitos são libertados da parede do folículo e amadurecem no centro do folículo, até serem formados os espermatozoides e posteriormente serem libertados. Os espermatozoides podem acumular-se na cavidade subgenital ou nos braços orais antes da libertação. A produção de gâmetas é dependente de vários fatores, entre eles a temperatura da água e incidência de luz (Arai, 2012).

O estudo do ciclo de vida permite uma melhor compreensão das variações das populações de medusa e ajuda na identificação de pólipos no terreno. Até o momento, o número de ciclos de vida de cifozoários que estão documentados é pequeno, em relação ao total de espécies. Relativamente ao Oceano Atlântico, 18 das espécies estudadas apresentaram ciclo de vida bifásico e metagénico, consistindo numa fase medusoide sexual pelágica e uma fase polipoide assexuado sésil (Figura 3), sendo assumido que este é o padrão mais frequente nos ciclos de vida dos cifozoários (Schiariti *et al.*, 2008; Arai, 2012; *Morais et al.*, 2017). No entanto, existem exceções, por exemplo, 3 das espécies estudadas no Atlântico (*Stygiomedusa gigantea*, *Pelagia noctiluca* e *Periphylla periphylla*) mostraram ser holoplantónicas, não apresentando fase sésil (Brotz, 2016). Para além disso, foi documentado que, em laboratório, *Aurelia aurita* foi capaz de desenvolver pólipos diretamente de medusas juvenis e também de desenvolver éfiras diretamente de plânulas (He *et al.*, 2015).

O padrão geral inclui um ovo fertilizado que se desenvolve numa plânula e de seguida num pólipo (scyphistoma). O pólipo é bentónico e liberta inúmeras éfiras, assexuadamente, via estrobilização, podendo estrobilizar mais do que uma vez por época. As éfiras desenvolvem-se rapidamente em medusas e tornam-se planctónicas. Os pólipos podem reproduzir-se assexuadamente ou formar podocistos (Figura 3) - estruturas capazes de sobreviver por mais de 3 anos com reservas energéticas (Thein *et al.*, 2012). Os podocistos são considerados elementos importantes na sobrevivência em condições adversas, como hipoxia e/ou temperaturas extremas, e como proteção na ocorrência de predação por nudibrânquios (Arai, 2009).

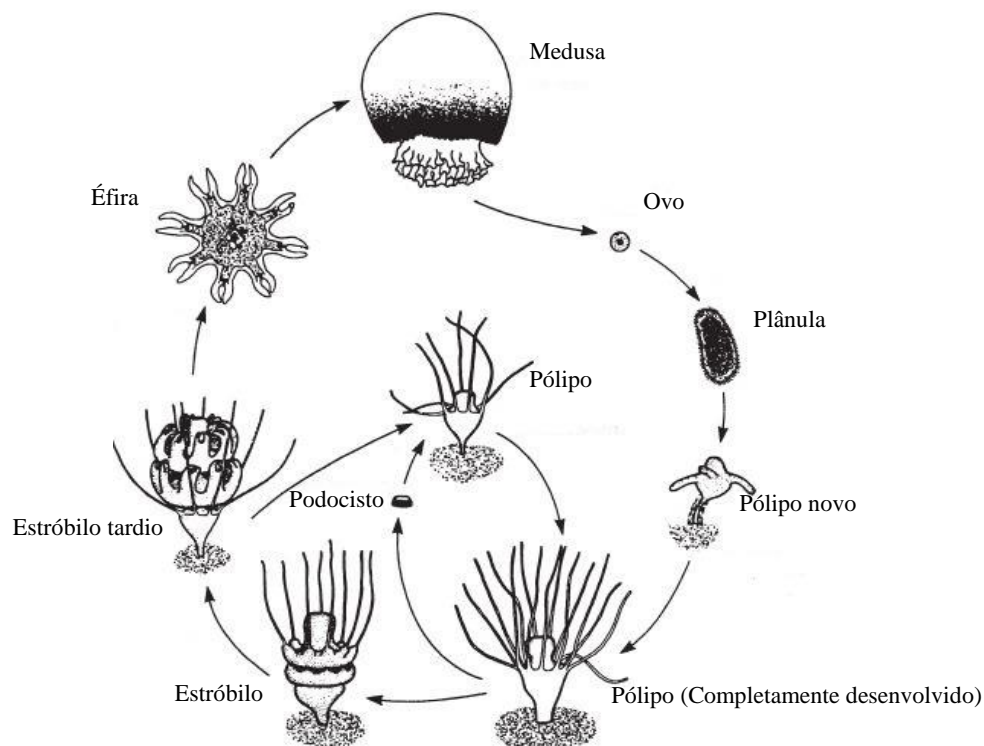


Figura 3- Exemplo de ciclo de vida de cifozeário, *Stomolophus meleagris* (Arai, 2012).

Como a taxa de crescimento dos pólipos e a sua capacidade de se multiplicarem assexuadamente tem um importante efeito na demografia da população de medusas (Lucas, 2001), tanto a fase bentônica como a fase pelágica do ciclo de vida do animal têm que ser consideradas, de modo a permitir compreender as mudanças no tamanho da população de medusas. No entanto, na maioria dos casos existe apenas informação para uma das fases, particularmente para a fase planctônica (Mills, 2001). A escassez de informação científica disponível pode dever-se ao facto de nesta fase do ciclo de vida as condições de estudo serem mais favoráveis.

Existem vários fatores que têm impacto na reprodução, no comportamento alimentar e no assentamento das plânulas de medusas estuarinas devido principalmente às mudanças de salinidade da água causadas pelas alterações de correntes de rio. Em relação à espécie *A. aurita*, Amorim *et al.* (2018) observaram que os pólipos com as maiores taxas de crescimento foram encontrados em áreas com salinidade média acima de 19 e a temperaturas intermédias (13,5–23,4 °C), permitindo um aumento da produção de éfiras. A mais baixa taxa de sobrevivência ocorreu em salinidade 15 e temperatura da água 25 °C.

A compreensão da dinâmica populacional dos cifozeários continua sendo extremamente reduzida e, como tal, o desenvolvimento de estratégias para gerir as ocorrências destes organismos e os seus

impactos continuam a ser um desafio. Uma mudança em direção à gestão baseada na reprodução e no ecossistema contribuiria para a construção do conhecimento sobre as interações entre o recurso e o meio ambiente, além de ajudar a identificar os impactos do desenvolvimento dos cifozoários (Boero *et al.*, 2008).

1.3. *Catostylus tagi*: Espécie de estudo

O estuário do Tejo alberga uma das mais importantes e grandes populações de cifozoário, *Catostylus tagi*, (Haeckel, 1869), que atribuiu o seu nome por associação ao rio Tejo (Tagus), de onde é nativa e é considerada o segundo maior invertebrado da Europa (Costello, Embrow & White, 2001). Para além do estuário do Tejo, também habita o estuário do Sado. O estudo de Parracho (2013) constatou que os espécimes do género *Catostylus* que ocorrem no Tejo e no Sado são da mesma espécie, através da sequenciação parcial das regiões de DNA ribossomal 18S, 28S e ITS1 de exemplares de ambos os estuários. A tabela 2 mostra a comparação de *C. tagi* que ocorre no Tejo e Sado e também os resultados médios de ambas em comparação com a espécie *C. mosaicus*.

Tabela 2- Similaridade entre as medusas *Catostylus tagi* do Tejo e do Sado e da sequência de consenso com *Catostylus mosaicus*, nas regiões estudadas (adaptado de Parracho, 2013).

Comparação	18S	28S	ITS1
<i>C.tagi</i> Tejo e Sado	97 (200/207)	99 (992/1004)	99 (374/378)
<i>C.tagi</i> e <i>C. mosaicus</i>	90 (902/1005)	90 (902/1005)	91 (41/45; <i>C. tagi</i> 88-132 e <i>C. mosaicus</i> 61-104) 81 (44/54; <i>C. tagi</i> 194-247 e <i>C. mosaicus</i> 209-259)

A figura 4 ilustra a semelhança entre o padrão do género *Catostylus* descrito por Stiasny (1922) e um exemplar de *C. tagi* corado com azul-de-metileno. A taxonomia atualmente adotada para *C. tagi* é a seguinte: domínio Eukarya, reino Animalia, filo Cnidaria, classe Scyphozoa, ordem Rhizostomeae, família Catostylidae, género *Catostylus*.

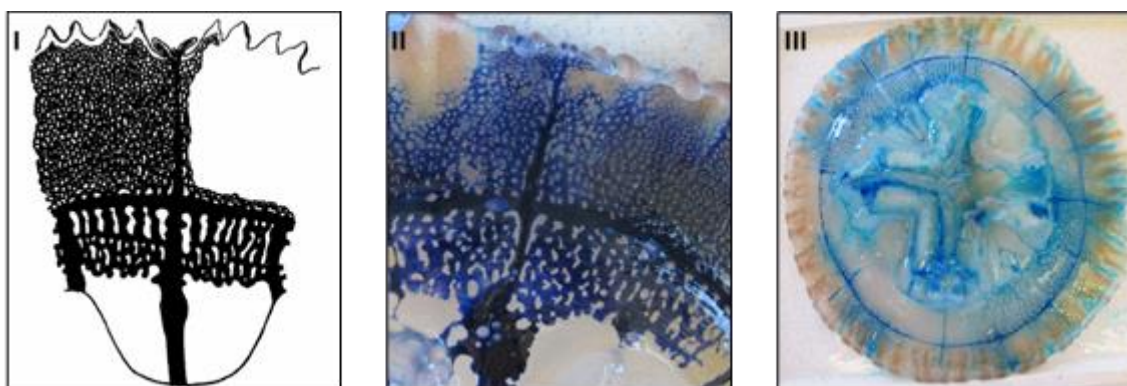


Figura 4- (I) Padrão dos canais da subumbela do género *Catostylus* (Stiasny, 1922); (II) Padrão dos canais da subumbela de um exemplar de *C. tagi*, corado por A. Morandini (foto por Raquel Lisboa, 2017); (III) Umbela de *C. tagi* corada seletivamente com azul-de-metileno por A. Morandini (foto por Raquel Lisboa, 2017).

O cifozoário *Lychnorhiza lucerna* (Haeckel 1880), da família Lychnorhizidae, género Lychnorhiza, nativo e o mais abundante do Atlântico Ocidental Sul, apresenta grande semelhança, no DNA ribossomal, nomeadamente nos fragmentos ITS1, 18S e 28S com cifozoários da família Catostylidae, género *Catostylus*, como mostra a figura 5. Deste modo, a informação referente à reprodução de *L. lucerna* pode fornecer um ponto de partida para o estudo deste tópico em *C. tagi*.

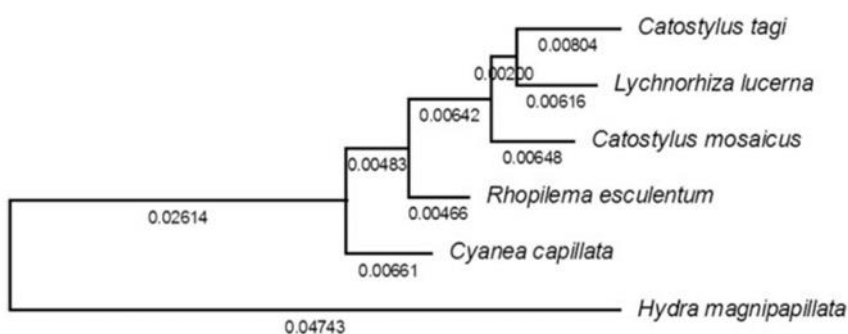


Figura 5- Cladograma baseado no 18S rDNA de *Catostylus tagi*, *Lychnorhiza lucerna*, *Catostylus mosaicus*, *Rhopilema esculentum*, *Cyanea capillata* e *Hydra magnipapillata* (Parracho, 2013).

O estuário do Tejo interliga-se com várias praias, pelo que, a oscilação natural das populações nativas pode ter consequências nas atividades humanas, tais como a pesca e atividades recreativas. Por exemplo, no verão de 2013, as praias de Carcavelos e da Costa da Caparica foram evacuadas devido ao aparecimento de erupções cutâneas/ urticária nos banhistas, existindo uma forte possibilidade destes incidentes terem ocorrido devido a um *bloom* de *C. tagi*, predominante nesta região (Morais & Parracho, 2014).

Foram realizados alguns estudos sobre *C. tagi*, para fins de aplicação em ciências da saúde como modelo em testes de ototoxicidade dos estatólitos, tendo sido utilizado o seu colagénio como matriz polimérica (Santos *et al.*, 2017; Calejo, 2009). Para além disso, também foi estudada como fonte de alimento. Raposo *et al.* (2018) confirmaram que a ingestão desta espécie é segura, mesmo para indivíduos alérgicos, e as suas propriedades organoléticas foram aceites pela população. Em particular, a umbela contém concentrações relevantes de ácidos gordos de cadeia muito longa, antioxidantes, colagénio e taurina, tornando-a uma possível fonte de suplementos alimentares, bem como uma potencial fonte para a produção de ingredientes especiais para a fabricação de alimentos para aquacultura (Morais *et al.*, 2009).

O interesse pela aquacultura desta espécie tem aumentado significativamente nas últimas décadas, porque a sazonalidade da ocorrência destes organismos compromete a utilização dos mesmos para o comércio ornamental. É assim necessário que futuros estudos sobre produtos naturais marinhos considerem o uso de espécimes produzidos em cativeiro. Esta abordagem permite uma obtenção mais fiável de biomassa de organismos produzidos em condições controladas em cativeiro, sendo para isso determinante ter um elevado grau de controlo sobre o ciclo de vida da espécie. No entanto, a manutenção destes organismos em aquários representa ainda um grande desafio, sendo necessário recorrer a sistemas de suporte de vida de complexidade moderada a elevada, sendo fundamental para isso obter o maior número de informação possível sobre esta espécie em geral e a sua reprodução e ciclo de vida em particular.

1.4. Objetivo do presente trabalho

O cifozoário utilizado neste estudo é a espécie *Catostylus tagi* (Haeckel, 1869). O estudo deste organismo num local onde ele é nativo (estuário do Tejo) pode possibilitar uma melhor gestão onde a sua presença constitui um problema. Para além disso, também permite que futuros pesquisadores tenham a caracterização da parte reprodutiva desta espécie como referência, a partir da qual podem comparar os seus resultados.

O presente trabalho, resultante de uma parceria entre o Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e a Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior CRL, teve como objetivo iniciar o estudo sistemático da biologia de *C. tagi*, com ênfase na caracterização do seu sistema reprodutivo e nas condições de fertilização *in vitro*. O presente trabalho pretende assim, caracterizar de forma detalhada a morfologia das gónadas femininas e masculinas desta espécie de cifozoário, os estádios de gametogénese, e realizar a fertilização *in vitro*, registando as fases de divisão celular, formação de plânula, assentamento e formação de pólipos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da área de estudo e amostragem do material biológico

As medusas *C. tagi* foram recolhidas na região da Trafaria (38°40'32.7"N 9°14'25.6"W; 38°40'27.7"N 9°14'04.0"W) no rio Tejo (Figura 6), em Setembro e Outubro de 2016, e em Junho, Julho e Setembro de 2017.

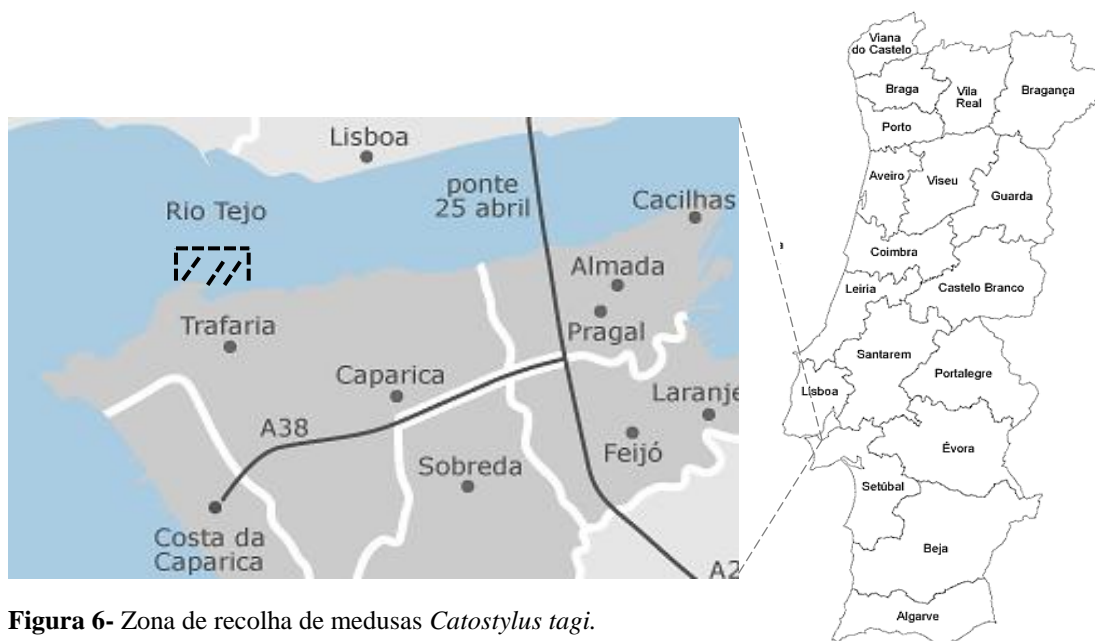


Figura 6- Zona de recolha de medusas *Catostylus tagi*.

O estuário do Tejo possui uma extensa área composta por pântanos salgados, que funcionam como zonas de reprodução de organismos. No estuário superior e médio, o sedimento é constituído principalmente por areia enlameada enquanto no estuário inferior e área costeira adjacente predomina a areia (Vinagre, Costa & Dunne, 2017). As características na Trafaria já são essencialmente marinhas, podendo, no entanto, nos meses de Inverno fazer-se sentir uma maior influência da água salobra/doce do Rio.

A tabela 3 apresenta as características gerais do estuário do Tejo, nomeadamente a área, a profundidade média, a variação da maré, o fluxo médio, a temperatura, a salinidade e o oxigénio dissolvido (Cabral e Costa, 1999; Caçador, 2011).

Tabela 3- Características gerais do estuário do Tejo (Cabral e Costa, 1999; Caçador, 2011).

Área (km ²)	Profundidade média (m)	Maré (m)	Fluxo médio (m ³ S ⁻¹)	Temperatura (°C)		Salinidade média (g/kg)	O ₂ dissolvido (mg/L)	
				Min.	Máx.		Min.	Máx.
325	10	4	400	12,8	22,2	34,5	1,9	9,2

O processo de recolha realizou-se num barco artesanal com auxílio de um camaroeiro (Figura 7A). As condições ambientais foram consultadas através do software WIFF (Sistema de previsão e monitorização em tempo real para a costa Portuguesa).

Ao longo do estudo foram realizadas 10 recolhas de exemplares. O número de exemplares recolhidos dependeu do propósito do estudo; no total foram recolhidos 100 organismos (Tabela 4).

Tabela 4- Número de exemplares de *Catostylus tagi* recolhidos ao longo do estudo e sua utilização.

Data	Nº de exemplares	Utilização
08/09/16	10	Medições, fixação e fertilização
14/09/16	10	
27/09/16	10	
28/09/16	10	
03/10/16	4	Estimulação de libertação de gâmetas
26/06/17	6	Observações e medições
12/07/17	15	Observações, medições e fixação
13/07/17	15	
04/09/17	10	Fertilização <i>in vitro</i>
07/09/17	10	

As amostras foram individualizadas através da marcação da subumbela com furos uniformes em ordem crescente, de 1 a 10. Este método revelou-se útil para a distinção dos exemplares (Figura 7B).

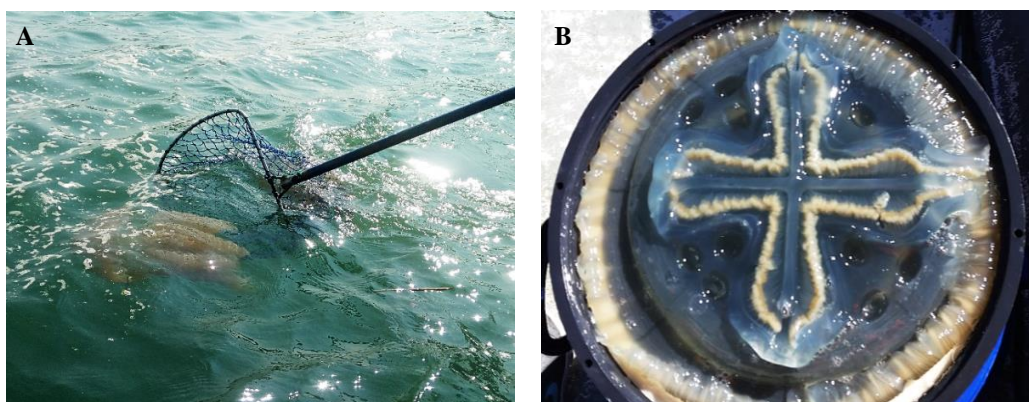


Figura 7- (A) Técnica utilizada na recolha das amostras de *Catostylus tagi*; (B) Exemplar de *Catostylus tagi* individualizado pela metodologia de marcação numérica da subumbela com furos uniformes, indicando ser o décimo organismo recolhido.

Consoante a utilização prevista, as amostras recolhidas foram armazenadas em conjunto ou em separado, no próprio barco ou no laboratório da Egas Moniz. A figura 8A mostra o armazenamento conjunto de medusas, utilizando um bidão de 50 L parcialmente cheio com água do local, e a 8B o armazenamento em separado utilizando um suporte plástico circular (300 mm) no qual as umbelas foram embaladas com filme plástico para dividir, proteger e facilitar as observações de cor. As

observações macroscópicas permitiram a medição do tamanho da umbela e a determinação visual da cor das gónadas.

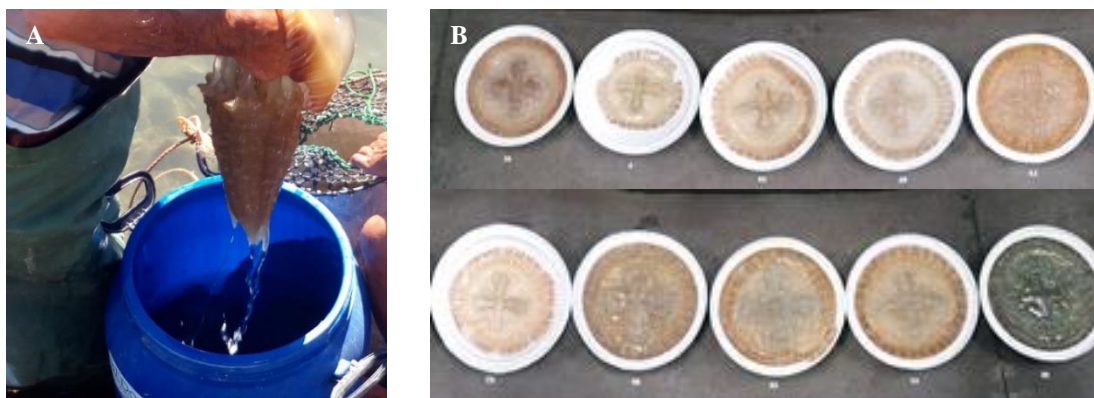


Figura 8- Armazenamento das amostras de *Catostylus tagi*. (A) Medusas inteiras em conjunto num reservatório; (B) Umbelas individualizadas em suportes.

2.2. Observações das gónadas

2.2.1. Medições dos gâmetas

Foram realizadas 3 recolhas de espécimes em 2016, nas quais foram retiradas amostras de gónadas, tendo estas sido armazenadas em diferentes fixadores (Figura 9), nomeadamente Bouin, Gendre, Hollande, etanol e formaldeído¹ (Lincoln & Sheals, 1979). Na primeira recolha, as amostras foram separadas por cor, verde ou castanha, portanto, existiam vários organismos com a mesma cor num mesmo recipiente (10 frascos no total). Na segunda recolha as amostras foram individualizadas no barco e mantidas nos diferentes fixadores anteriormente referidos, ou seja, amostras dos 10 espécimes recolhidos divididas pelos 5 fixadores (50 tubos de ensaios no total), para determinar o fixador que permite uma melhor observação dos tecidos. Na terceira recolha fizeram-se observações macroscópicas e microscópicas apenas de material biológico fresco de 10 espécimes recolhidos. Na quarta recolha, as amostras de gónadas dos 10 espécimes recolhidos foram individualizadas no barco, divididas e mantidas apenas em etanol e formaldeído (20 tubos de ensaio no total). Em 2017, foram realizadas apenas duas saídas de campo para a observação e medição de gâmetas. Foi recolhida uma amostra de cada espécime (30 espécimes no total) e armazenada individualmente em formaldeído.

¹ Ver Anexo I para uma descrição detalhada das soluções utilizadas.



Figura 9- Amostras de *Catostylus tagi* recolhidas em 2016.

As medições dos gâmetas (em μm) foram efetuadas após o armazenamento nos fixadores Bouin, Gendre, Hollande, etanol e formaldeído. Todas as medições foram realizadas em microscópio ótico ATC 2000 (Leica, Alemanha), na Egas Moniz. Foi observada uma amostra de cada espécime nos diferentes fixadores e em cada amostra realizaram-se 5 medições aleatórias. No total, realizaram-se 600 medições, com erro associado de $\pm 1\mu\text{m}$.

Regra geral, os ovócitos possuem forma arredondada e, portanto, o tamanho foi definido pelo diâmetro. As células que possuem forma irregular ou retangular, como os folículos espermáticos, foram medidas pelo lado de maior comprimento.

2.2.2. Ensaios histológicos

No desenvolvimento deste trabalho foram realizados 2 ensaios histológicos. O ensaio histológico realizado no IPMA consistiu na coloração de hematoxilina-eosina, baseada no método descrito por Martoja *et al.* (1967). Foram escolhidas amostras de quatro organismos (duas fêmeas e dois machos) que estavam fixados em etanol. Foi utilizado o microscópio BA410 Motic com câmera Moticam 10 (Motic, Hong Kong) para a observação.

Para a preparação do ensaio histológico foram utilizadas na *Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa* ESTsEL, as amostras fixadas em formaldeído. Os ensaios de coloração incluíram as colorações: azul ciano, negro sudão e Von Kossa. Após a desidratação da amostra e montagem em bloco de parafina, efetuaram-se os cortes histológicos e as técnicas de coloração segundo os procedimentos de rotina daquela instituição. Os resultados foram observados e registados fotograficamente num microscópio Leica DM 750 com câmara Leica ICC50 HD (Leica, Alemanha).

Em ambos os casos a ocular tinha ampliação de 10x e as objetivas usadas foram de 10x, 40x e 100x. Nas figuras deste trabalho as ampliações são referidas consoante a ocular e a objetiva (100x, 400x e 1000x).

2.2.3. Microscopia eletrónica de varrimento, SEM

A partir das amostras fixadas em cada solvente foram selecionados machos e fêmeas para análise por microscopia eletrónica de varrimento. As observações foram realizadas no MicroLab IST / UL, com o equipamento JSM-7001F (JEOL, Japão). Foram colocados 50 µl de cada amostra num suporte de amostra e depois revestida com uma película fina de Au / Pd (30 nm de espessura) (Figura 10).



Figura 10- Equipamento de microscopia electrónica, IST/UL. (A) Visão geral do SEM; (B) Visão compartimento de amostra.

2.3. Procedimentos de fertilização *in vitro*

Em Setembro de 2017, foram realizadas duas saídas de campo durante a maré baixa. Em cada saída foram recolhidos 10 organismos (utilizando o mesmo método anteriormente referido) e retiraram-se as gónadas a bordo e foram mantidas num falcon de 50 mL com água do local guardados num recipiente com gelo para conservar a temperatura.

No laboratório, retiraram-se amostras das gónadas de cada organismo e observou-se à lupa EZ4 (Leica, Alemanha), de forma a identificar o sexo e retirar filamentos gástricos que pudessem comprometer a integridade das gónadas. De seguida, para dar início ao processo de fertilização *in vitro*, foram selecionadas amostras de machos e fêmeas com base na qualidade dos gametas e foram colocadas em recipientes com 80 mL de água do local, representado no esquema da Figura 11.

Os ensaios realizados tiveram em conta a presença e ausência de substrato, de forma a analisar a preferência das plânulas à presença/ausência de substrato. No ensaio com substrato, a amostra da gónada da fêmea 2 foi colocada juntamente com amostra da gónada do macho 1 num recipiente com substrato de madeira. Amostras das gónadas da fêmea 10 e do macho 4 também foram colocadas juntas em 4 recipientes, cada um com substrato diferente (areia, concha, madeira e plástico).

No ensaio sem substrato, amostra da fêmea 2 foi colocada juntamente com o macho 7 em 2 recipiente em horas diferentes (15h46 e 16h46). Amostra da fêmea 3 foi colocada juntamente com 4 machos em 4 recipientes. A amostra da fêmea 10 foi colocada com 3 machos em 3 recipientes. Após a libertação dos gâmetas, foram removidos dos recipientes os tecidos das gónadas, de forma a não comprometer a fertilização.

Os recipientes foram colocados em agitadores orbitais, com agitação suave, a 19 °C, para reproduzir as condições do Tejo.

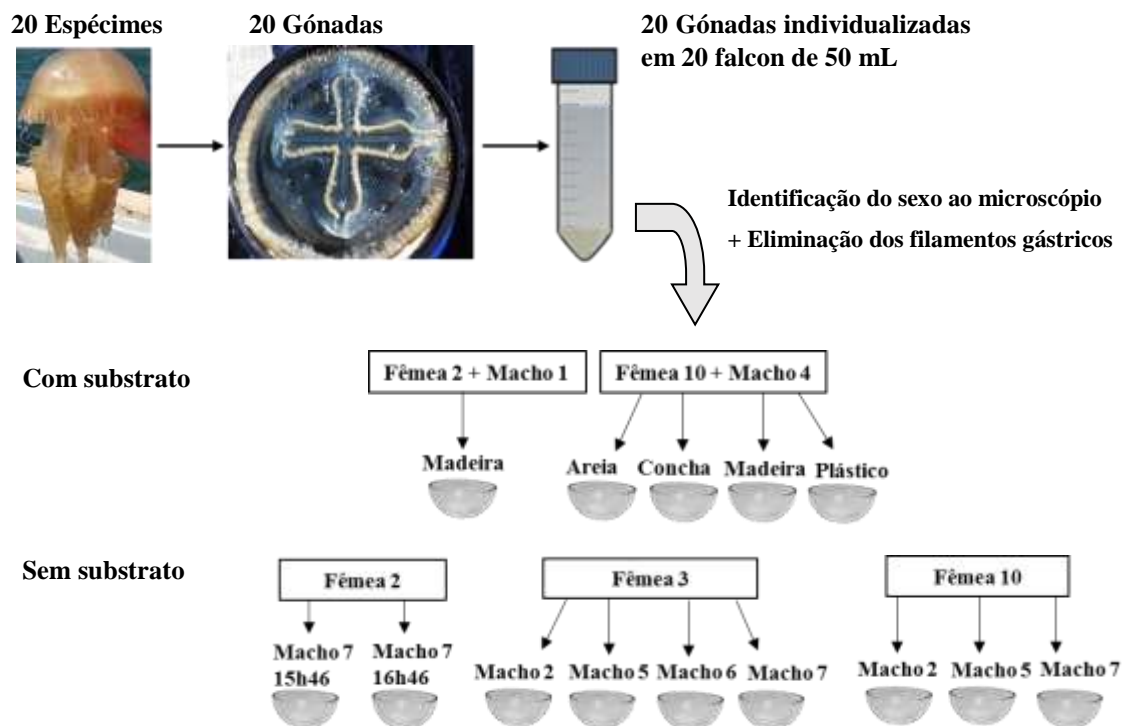


Figura 11- Esquema do processo de fertilização *in vitro* a partir dos espécimes recolhidos.

Os registos dos estádios iniciais da divisão celular após a fertilização *in vitro* foram realizados na Egas Moniz, em lâminas adequadas, utilizando o microscópio DMLB com câmara DFC 290 HD e *software* Las V4.12 (Leica, Alemanha). A calibração do microscópio foi realizada com a lâmina de 1 mm grátulas (pyser-SGILTD, UK).

2.4. Observações e procedimentos para a sobrevivência dos pólipos

A formação, crescimento e sobrevivência dos pólipos foram acompanhados diariamente com observações à lupa S9i Stereozoom com câmara integrada (Leica, Alemanha)

(Figura 12). A cultura dos pólipos foi realizada em condições constantes de temperatura (19 ± 1 °C) e salinidade (34 ± 1). Para além disso, os recipientes foram mantidos no escuro, a fim de minimizar o crescimento de algas.

Quando a maioria dos pólipos de cada recipiente formou 6 tentáculos, passaram a ser alimentados a cada 2 dias, alternando-se o fornecimento de gónadas femininas de mexilhão maceradas e rotíferos fornecidos *ad libitum*.

Foram removidos diariamente, com uma pipeta Pasteur, os ovos de mexilhão, rotíferos mortos, e quaisquer outras partículas de lixo detetadas nos recipientes. Aproximadamente entre 20% a 50% da água em cada recipiente foi removida após os pólipos terem sido alimentados e substituída por água do local filtrada, com os mesmos parâmetros termohalinos descritos acima.

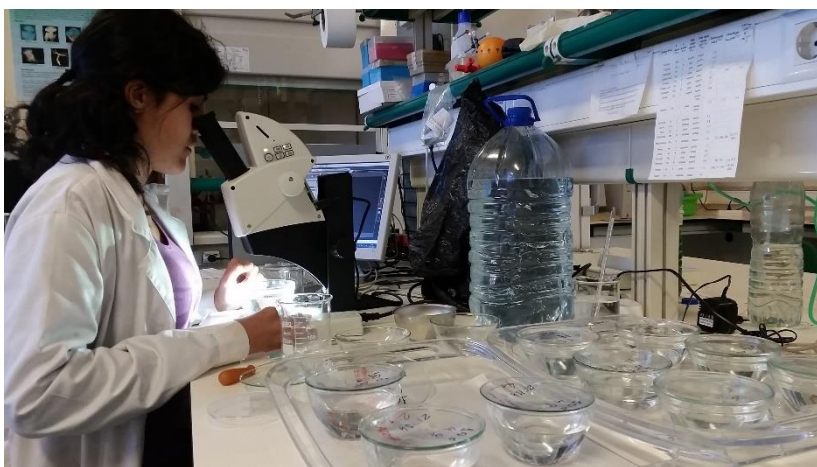


Figura 12- Acompanhamento da sobrevivência dos pólipos de *Catostylus tagi*, em lupa S9i.

2.5. Análise estatística

Neste trabalho, o tratamento de resultados foi realizado utilizando os programas Excel versão 2013 (Microsoft, EUA) e SPSS versão 25 (IBM, EUA). A normalidade dos grupos de dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk; aqueles com distribuição não gaussiana foram analisados através de testes não paramétricos. Para comparar grupos independentes em que a variável dependente era ou ordinal ou contínua, mas não normalmente distribuída utilizou-se o teste U de Mann-Whitney.

Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. Os testes estatísticos aplicaram-se à comparação das dimensões bianuais dos ovócitos e dos folículos espermáticos.

3. Resultados

3.1. Morfologia das gónadas femininas e masculinas

Foram recolhidos, no total, 100 exemplares de *C. tagi*. A figura 13 ilustra um dos exemplares de *C. tagi* recolhidos, o qual possui umbela com cerca de 220 mm. As propriedades de massa e dimensão inseriram-se nos intervalos anteriormente descritos em Morais *et al.* (2009), designadamente: massa média total $2424,7 \pm 642,4$ g; massa média da umbela $1024,8 \pm 212,6$ g; diâmetro médio da umbela 229 ± 12 mm; comprimento médio do braço mais longo 268 ± 64 mm.

Esta espécie é caracterizada por possuir uma umbela afunilada e braços orais ramificados de cor amarelo-castanho. Os oito braços orais estão conectados por um anel de canais ramificados. Alguns dos quais prolongam-se até ao extremo da umbela, onde existem oito órgãos sensoriais, conhecidos como ropália.



Figura 13- Exemplar típico de medusa *Catostylus tagi* recolhido no Teio.

A cavidade gastrovascular consiste numa estrutura de quatro extremos em forma de cruz, constituída por uma série de canais, que formam um sistema circulatório aberto à cavidade do estômago. As regiões periféricas, bolsas ou canais permitem que o alimento seja distribuído da cavidade do estômago na umbela, para os tentáculos e para os braços orais. As gónadas surgem da gastroderme e podem possuir várias colorações, castanho, verde e esbranquiçado (Figura 14A e B). A observação das gónadas de *C. tagi* permitiu confirmar que as fêmeas possuem ovócitos com forma esférica regular com uma parede celular bem definida enquanto nos machos são observados folículos com forma alongada irregular (Figura 14 C e D).

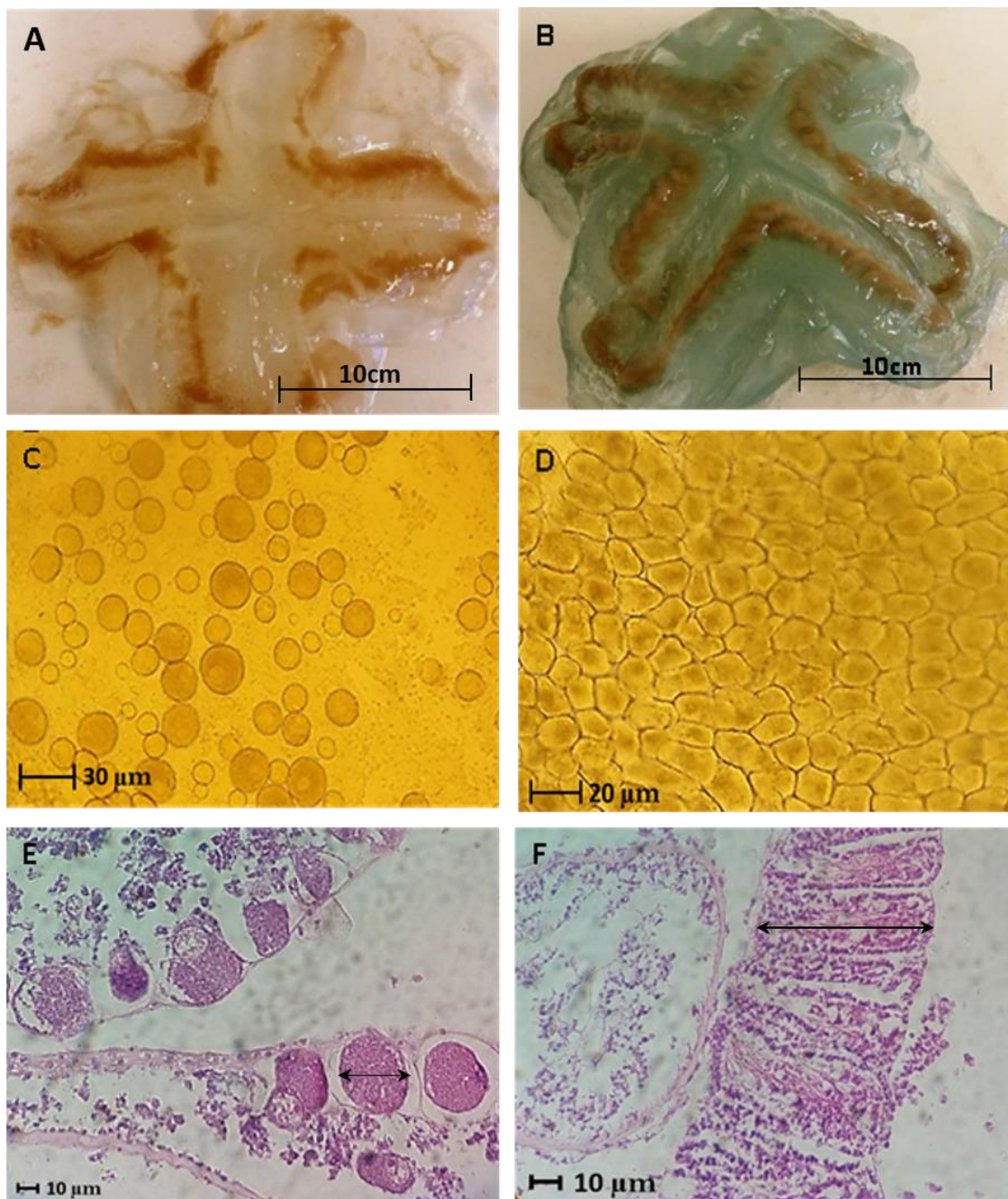


Figura 14- Gónadas de *Catostylus tagi*. (A) Gónada feminina fresca, barra de escala 10 cm; (B) Gónada masculina fresca, barra de escala 10 cm; (C) Ovócitos em formaldeído, barra de escala 30 µm; (D) Folículos espermáticos em formaldeído, barra de escala 20 µm; (E) Ovócitos com coloração hematoxilina-eosina, barra de escala 10 µm; (F) Folículos espermáticos com coloração hematoxilina-eosina, barra de escala 10 µm. As barras em (E) e (F) indicam o modo de medição dos comprimentos.

As figuras 14E e 14F ilustram o modo de medição dos gametas de *C. tagi* cujos resultados gerais se apresentam no diagrama de extremos e quartis da figura 22. Em resumo, em Setembro de 2016, o intervalo medido situou-se entre 17 e 44 µm, mediana 30 µm, para o diâmetro dos ovócitos das fêmeas (n=95), e entre 11 e 40 µm, mediana 25 µm, para a extremidade mais longa dos folículos

espermáticos dos machos (n=305). Em Junho de 2017, os ovócitos (n=40) apresentaram o intervalo 26-42 μm , mediana 25 μm , e os folículos espermáticos (n=110) 11-29 μm , mediana 24 μm . A aplicação do teste U de Mann-Whitney indicou não haver diferença significativa entre o diâmetro dos ovócitos ($p > 0,05$) de 2016 e 2017, mas sim nos comprimentos dos folículos espermáticos ($p < 0,05$).

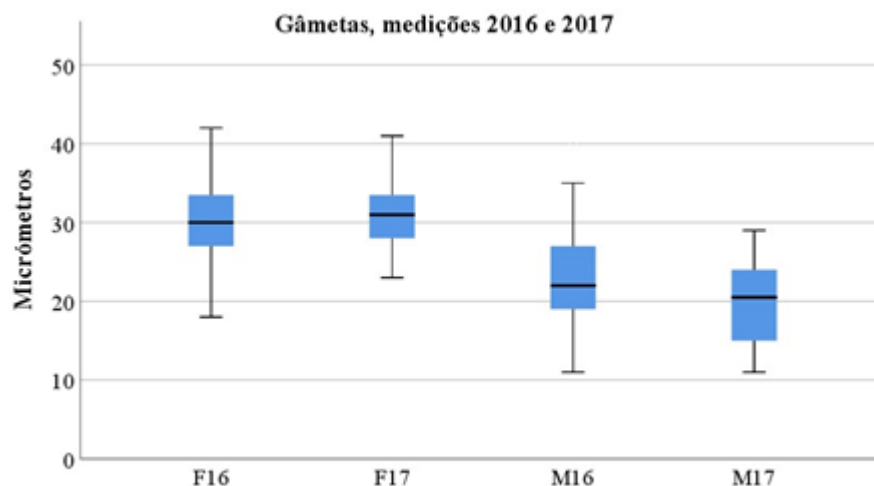


Figura 15- Gónadas femininas e masculinas de *Catostylus tagi*. F16 e F17: diâmetro dos ovócitos em Setembro 2016 (n=95) e Junho-Julho 2017 (n=40), respetivamente. M16 e M17: comprimento dos folículos espermáticos em Setembro 2016 (n=305) e Junho-Julho 2017 (n = 110), respetivamente.

Inicialmente investigou-se a ocorrência de dimorfismo sexual, tanto em relação à cor das gónadas como em relação ao diâmetro da umbela. Determinou-se o sexo, cor das gónadas e diâmetro de umbela em 73 exemplares (Tabela 5). A 20 dos organismos recolhidos determinou-se apenas o sexo, para fins de fertilização *in vitro*. Dos 7 organismos restantes, 4 não foram caracterizados (ensaio de fertilização) e 3 não apresentavam gónadas desenvolvidas.

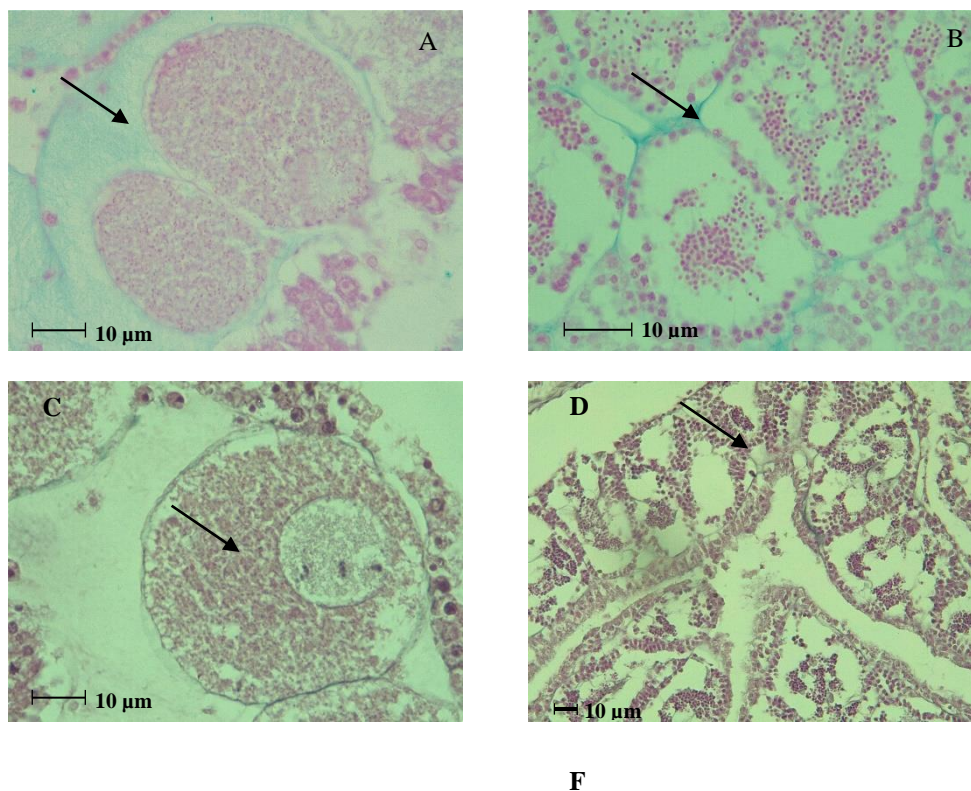
A proporção de machos encontrados foi de 70% em 2016 (28 em 40) e de 57% em 2017 (30 em 53), correspondendo no total a 62% (58 em 93). Com estes dados, não se verificou nenhuma tendência uma vez que, os machos representaram mais de 50% dos organismos com gónadas verdes ou castanhas (Tabela 5) e a comparação estatística, pelo teste U de Mann-Whitney, indicou não haver diferença significativa na cor de machos e fêmeas.

Tabela 5- Sexo, cor e diâmetro da umbela de exemplares de *Catostylus tagi* recolhidos em 2016 e 2017.

2016						
	Verde	Castanho	Total	Diâmetro umbela (,m)		
				Min.	Máx.	Média
MACHO	15	13	28	210	260	231±21
FÊMEA	4	8	12			
2017						
	Verde	Castanho	Total	Diâmetro umbela (mm)		
				Min.	Máx.	Média
MACHO	20	3	23	160	290	204±31
FÊMEA	8	2	10	170	280	220±35

3.2. Estudos preliminares sobre a histoquímica e a citoquímica das gónadas

No presente trabalho iniciaram-se os estudos histoquímicos e citoquímicos das gónadas de *C. tagi* mas não foi possível otimizar cada coloração, pelo que, as amostras foram tratadas segundo os procedimentos utilizados em humanos. Apresentam-se os resultados obtidos em gónadas femininas e masculinas de *C. tagi* referentes às colorações: azul ciano, negro Sudão e Von Kossa (Figura 26).



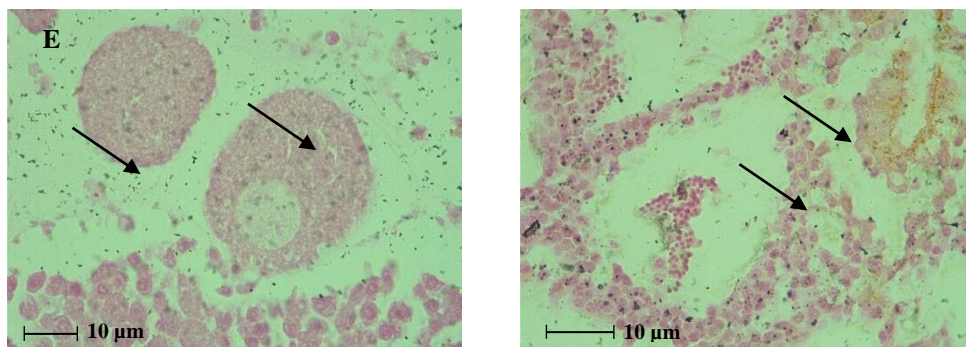


Figura 16- Coloração histoquímica das gónadas de *Catostylus tagi* com os corantes azul ciano, negro Sudão, e Von Kossa. (A) Gónadas de fêmea coradas com azul ciano; (B) Gónadas de macho coradas com azul ciano; (C) Gónadas de fêmea coradas com negro Sudão; (D) Gónadas de macho coradas com negro Sudão; (E) Gónadas de fêmea coradas com Von Kossa; (F) Gónadas de macho coradas com Von Kossa. As setas destacam o resultado de cada coloração. Escala indicada na figura.

Através da coloração azul ciano, detetaram-se mucinas nas gónadas. As fotomicrografias mostram as mucinas no exterior dos óvulos e dos folículos espermáticos e sugerem que as mucinas não fazem parte da membrana perimetral destas células (Figura 16 A e B). Pela coloração negro Sudão, os lípidos foram localizados sobretudo no interior das células segundo uma distribuição contínua. (Figura 16 C e D). Com a coloração de Von Kossa, detetou-se a presença de cálcio, em distribuição descontínua, dentro e fora das células (Figura 23 E e F).

3.3. Estádios de gametogénese, ovogénese e espermatogénese

Ovogénese

A figura 17 ilustra o corte histológico da gónada feminina, com coloração hematoxilina-eosina, nas ampliações 100x (A), 400x (B) e 1000x (C).

Verifica-se que a parede genital é constituída por várias camadas, em que se destacam um epitélio genital externo de origem ectodérmica (EpG), a epiderme (Ep), a gastroderme (G) e um tecido mesogleico (Mg), entre estas últimas camadas, onde se situam os ovócitos de vários tamanhos (Fig. 17A).

Pelas características da *C. tagi* observadas neste trabalho, constatou-se ser possível classificar as fases da sua ovogénese utilizando o critério proposto por Schiariti (2008). Assim, em função da densidade de grânulos de vitelo, do nível de basofilia do citoplasma, e do tamanho, estabeleceram-se quatro fases de ovócitos: pré-vitelogénese (PV), vitelogénese inicial (VI), vitelogénese intermédia (VM) e vitelogénese avançada (VA) (Fig. 17B).

Na primeira fase de vida (PV) os ovócitos possuem forma arredondada e o núcleo (N) destacado. O ooplasma (Op) apresenta-se escuro devido à elevada basofilia. Para além disso, os ovócitos estão associados à epiderme (Ep).

Na fase seguinte (VI) inicia-se a vitelogénese, e os ovócitos adquirem um maior tamanho do que as células ao seu redor. Para além disso, projetam-se na mesogleia mantendo contato com a gastroderme através dos trofócitos (Tr) (Fig. 17C).

Na fase intermédia (VM), os ovócitos moveram-se quase completamente das gastroderme, a única ligação que têm é pelo trofócito. A quantidade de grânulos aumentou e o ooplasma apresenta uma coloração mais clara. O núcleo vai situar-se na direção da gastroderme, onde há contacto entre a gastroderme e os trofócitos. A maior parte dos ovócitos apresentam-se maduros e com um nucléolo (Nlo) evidente.

A próxima fase (VA) é determinada pela presença de ovócitos com uma coloração mais clara e cobertos de grânulos de vitelo. Para além disso, apresentam grandes núcleos, indicando que está no estado final da ovogénese.

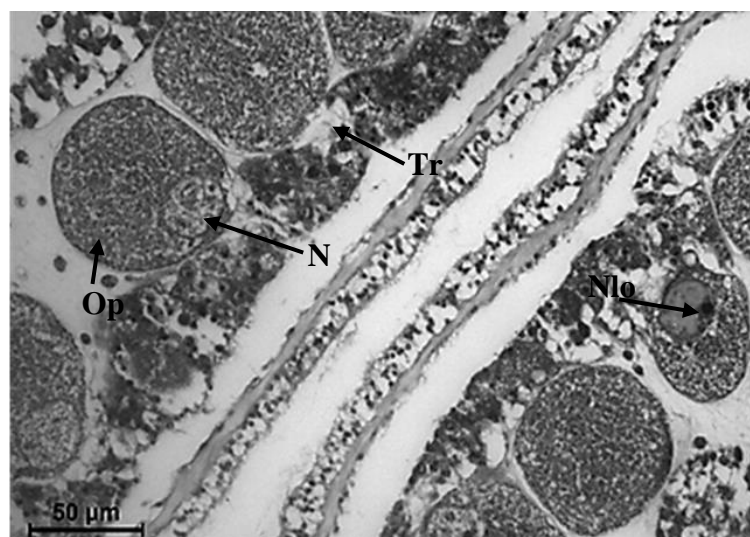
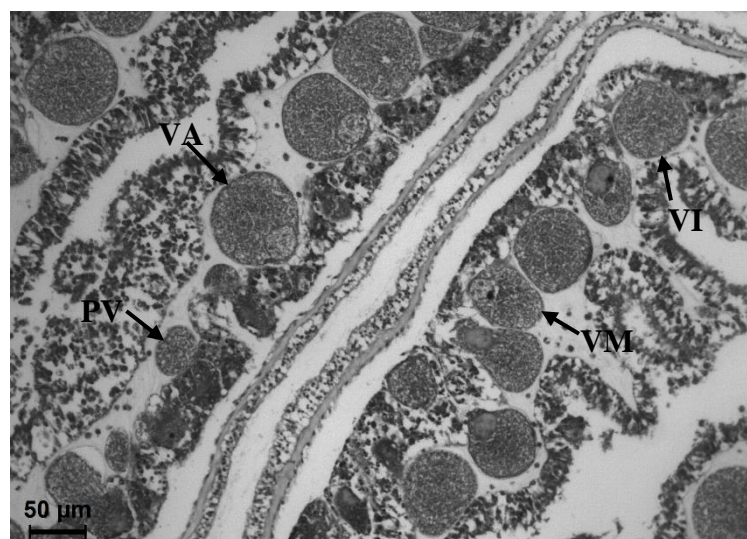
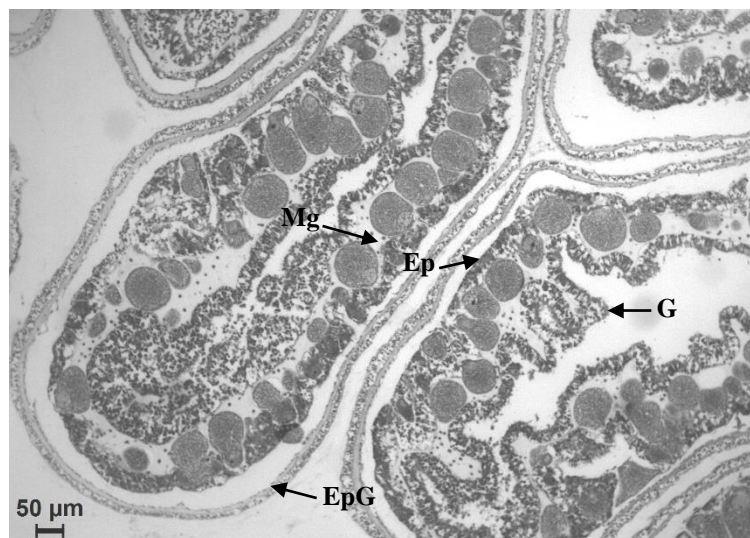


Figura 17- Corte histológico de gónada feminina de *Catostylus tagi* com ovócitos em diferentes estádios. (A) 100x; (B) 400x; (C) 1000x. (N) Núcleo; (Op) Ooplasma; (PV) Pré-vitelogénese; (Tr) Trofócito; (VA) Vitelogénese avançada; (VI) Vitelogénese inicial; (VM) Vitelogénese intermédia. Coloração hematoxilina-eosina. Escalas indicadas nas figuras.

Espermatogénese

As gónadas masculinas são compostas por folículos espermáticos (FE), que possuem forma retangular, dentro dos quais ocorre a espermatogénese (espermatídios em espermatozoides), que se desenvolve em direção ao centro do folículo.

A partir da gastroderme surgem os espermatogónios (EG), células esféricas que se encontram no início do folículo espermático. Estas células diferenciam-se em espermatócitos (EC), possuem forma esférica, citoplasma reduzido e núcleo denso.

De seguida formam-se os espermatídios (ET), com tamanho e citoplasma reduzido e mais escuro. Por fim, estas células vão diferenciar-se em espermatozoides (EZ) através do processo conhecido como espermiogénese. Este processo consiste principalmente na transformação dos ET em EZ através da eliminação do citoplasma, e com o crescimento gradual da cauda dos EZ.

No estágio final da espermatogénese, os EZ estão localizados com as cabeças juntas formando grupos densos com as caudas espalhadas. Após a maturação, o EZ é libertado do folículo espermático para a cavidade subgenital. Os folículos espermáticos entram no estado pós-evacuação, em que se observa uma possível reversão folicular (presença de células e espaços livres no seu lúmen).

Simultaneamente com o estado de reversão folicular, observou-se a presença de EG, EC e ET no lúmen, indicando que as várias fases podem coexistir dentro do mesmo folículo.

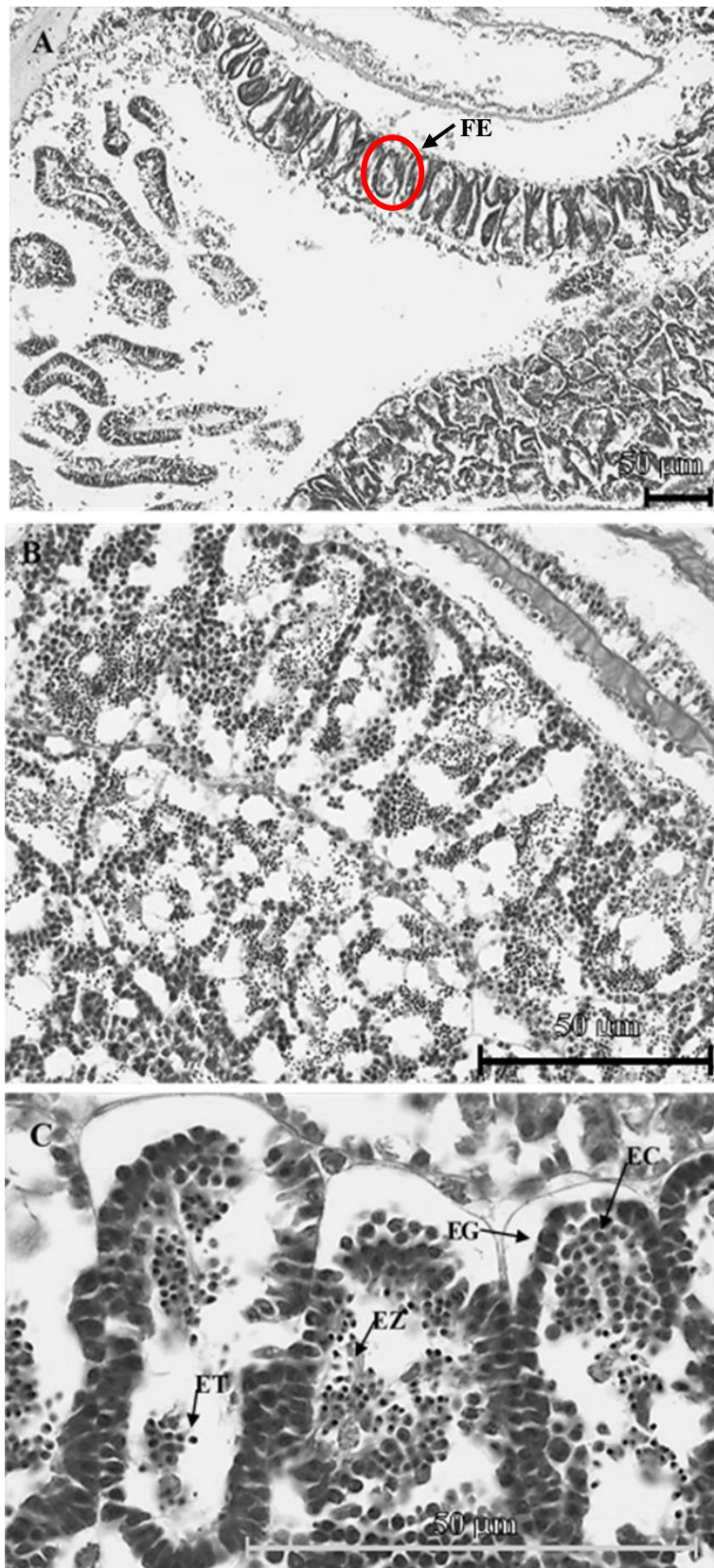


Figura 18- Corte histológico de gónada masculina de *Catostylus tagi* com diferentes estádios de espermatogénese. (A) 100x; (B) 400x; (C) 1000x. (EC) Espermatócitos; (EG) Espermatogónios; (ET) Espermatídios; (EZ) Espermatozoides; (FE) Folículo espermático. Coloração hematoxilina-eosina. Escalas indicadas nas figuras.

3.4. Observações por microscopia eletrônica de varrimento, SEM

Dentre os fixadores testados, o formaldeído revelou-se o mais compatível para as imagens em SEM. As figuras 19A e 19B mostram gónadas femininas e masculinas intactas; os ovócitos com uma dimensão de 35 a 55 μm de diâmetro e os folículos espermáticos com dimensões de 18x30 μm a 28x45 μm .

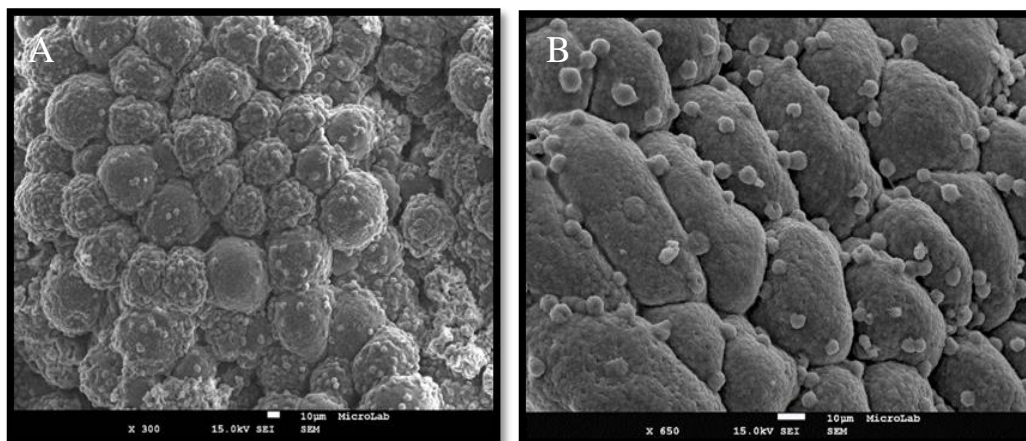


Figura 19- Observações SEM das gónadas de *Catostylus tagi*. (A) Ovócitos intactos; (B) Folículos espermáticos intactos.

De referir que as medições dos ovócitos e folículos espermáticos nas colorações histológicas e em microscopia eletrônica apresentaram resultados ligeiramente superiores, em geral na gama de 15-60 μm para os ovócitos e 15-50 μm para os folículos espermáticos, que os observados nas medições com os fixadores.

3.5. Ensaios de fertilização *in vitro*

Foi possível observar ovos fecundados com corpos polares após 2 h da fertilização ter ocorrido. A partir do ovo fecundado até ao início da divisão celular passaram sensivelmente 6 h. A partir de então, 90 minutos a 120 minutos foram suficientes para a formação de aproximadamente 64 células.

As plânulas formaram-se, em média, 24 h após a fecundação ter ocorrido. Algumas plânulas converteram-se em pólipos muito rapidamente (~2 h). No entanto, o tempo de desenvolvimento de um pólipo recém-assentado num pólipo com 4 tentáculos em estado avançado teve a duração de aproximadamente 46 h, sendo assim a mais lenta das etapas de desenvolvimento pós-fecundação.

A tabela 6 apresenta a compilação da evolução do ovo fecundado de *C. tagi* ao pólipo em estado avançado, em 12 etapas. A figura 20 ilustra proporcionalmente o tempo de cada etapa.

Tabela 6- Caracterização e duração das etapas da evolução do ovo fecundado de *Catostylus tagi*.

Etapa	Evolução do ovo fecundado	Tempo após a fertilização (horas)
1	Ovo fecundado com presença de corpos polares	2
2	Início da divisão celular	8
3	2 Células	8,5
4	4 Células	8,75
5	8 Células	9
6	~ 64 Células	9,5
7	Plânula	24
8	Plânula em estado avançado	25
9	Pólipo recém-assentado	26
10	Pólipo com 3 tentáculos	48
11	Pólipo com 4 tentáculos	48
12	Pólipo com 4 tentáculos em estado avançado	72

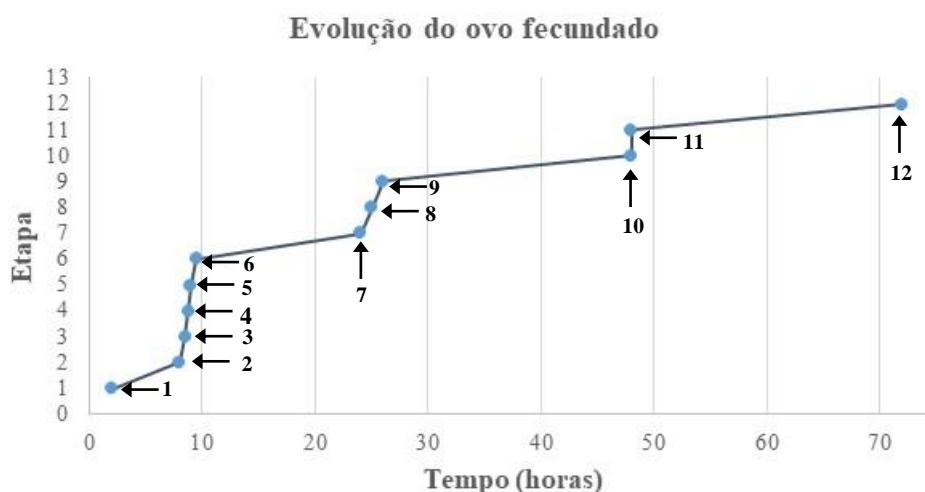


Figura 20- Cronologia das etapas de evolução do ovo fecundado de *Catostylus tagi*.

A figura 21 apresenta seis fotomicrografias de divisões radiais e holoblásticas dos embriões em desenvolvimento da *C. tagi*. Este processo começou com uma célula (188 μm) com corpos polares (A) e de seguida, a primeira divisão (B) iniciou-se num dos pólos da célula e o embrião transformou-se em forma de coração (211 μm). A primeira e segunda divisão ocorreram longitudinalmente, formando 2 células com 233 μm (C), enquanto a terceira divisão foi horizontal, transformando em 4 células com 250 μm (D). A membrana vitelina era claramente visível e desenvolveu-se o estágio de oito células com 227 μm (E). Os embriões passaram ainda pelos estágios da mórula e da blástula com 214 μm (F).

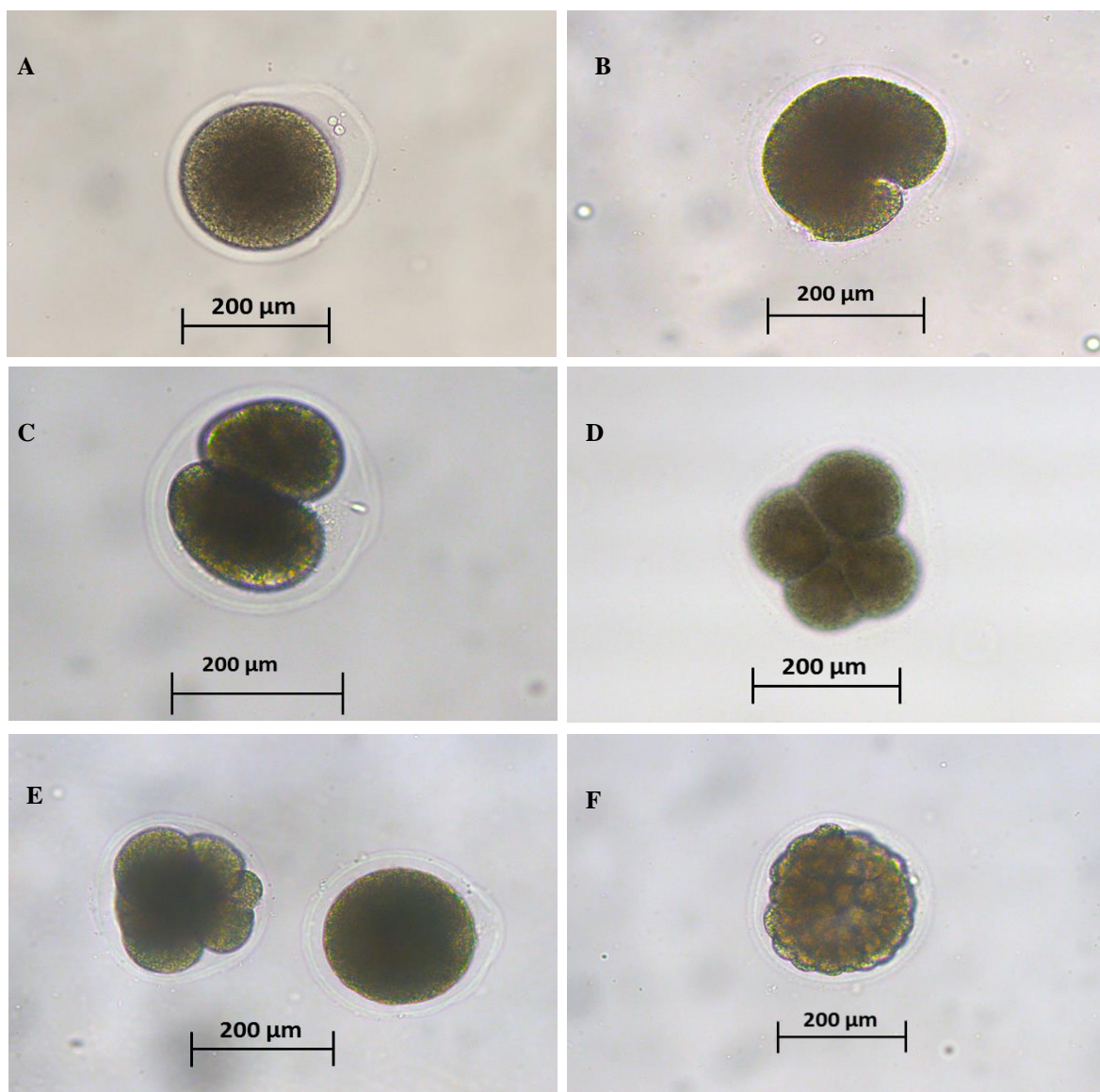


Figura 21- Observações a fresco das divisões celulares resultantes da fertilização *in vitro* de *Catostylus tagi*. (A) Ovo fecundado com presença de corpos polares; (B) Início da divisão celular; (C) Divisão em 2 células; (D) Divisão em 4 células; (E) Divisão em 8 células; (F) Divisão em ~ 64 células. Escalas indicadas nas figuras.

As duas plânulas da figura 22A observaram-se após 24 h de fertilização, uma com cerca de 338 µm de comprimento e 175 µm de largura, outra com aproximadamente 287 µm de comprimento e 175 µm de largura, na parte mais larga, e 100 µm de largura, na parte mais estreita. Ambas as plânulas possuíam extremidades arredondadas e coloração castanha. Foi possível visualizar os cílios que tornam possível o movimento natatório destes organismos. A resolução disponível não permitiu distinguir a presença nem a localização dos nematócistos na plânula, pelo que não foi possível

verificar se os mesmos tinham uma distribuição homogênea ou se se localizavam numa região específica.

Na fase seguinte (Figura 29B), a plânula (400 μm) encontra um substrato e começa o início do assentamento com a perda do movimento e o ganho de talo vestigial. Por último (Figura 29C), a forma de plânula desaparece por completo e forma-se uma estrutura em forma de pêra (275 μm), com um talo já desenvolvido.

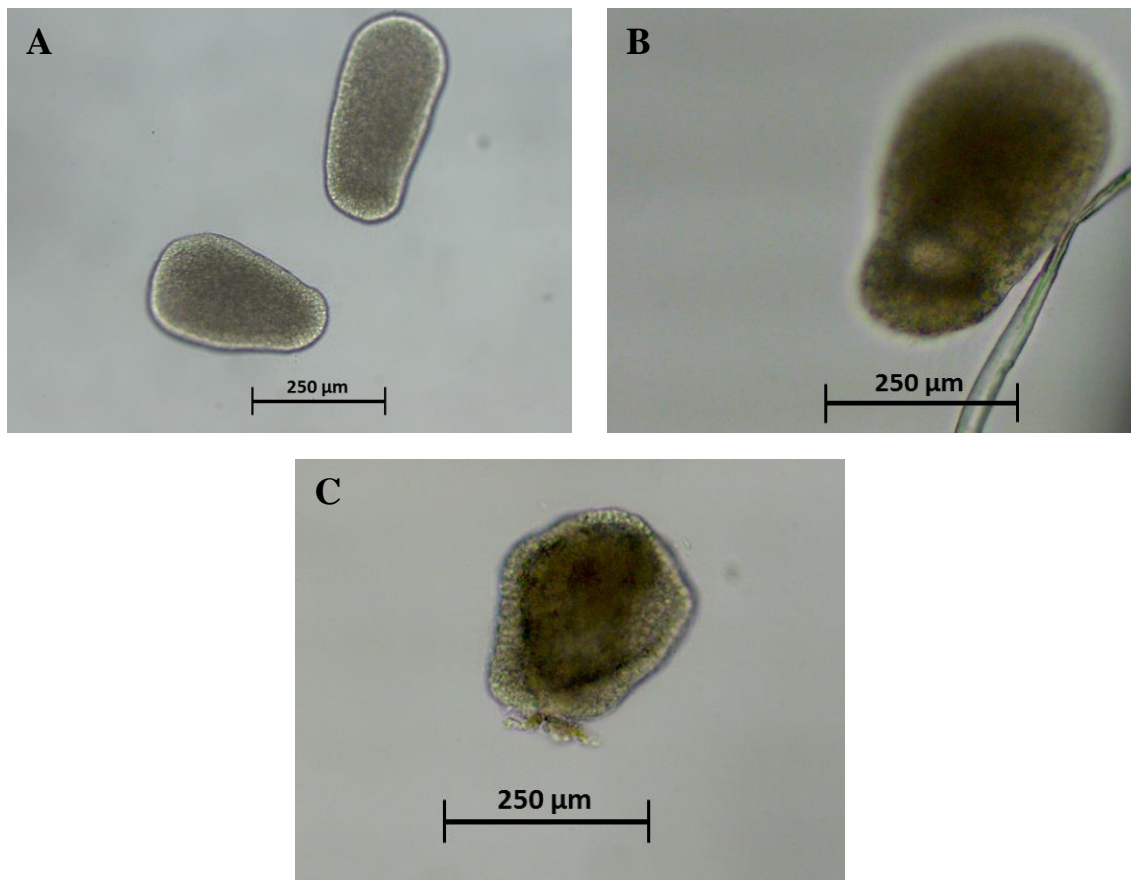


Figura 22- Observações a fresco dos organismos resultantes da fertilização *in vitro* de *Catostylus tagi*. (A) Plânula; (B) Plânula em estado avançado; (C) Pólipo recém-assentado. Escalas indicadas nas figuras.

As observações seguintes demonstraram que os pólipos começaram a formar corpos colunares que se ligaram a um substrato duro na superfície aboral (Figura 23). Os pólipos mais desenvolvidos possuíam a parte superior do corpo em forma de cálice, num talo curto, e começaram a desenvolver a superfície oral, sendo esta composta por um anel de tentáculos em torno de uma boca central, conhecida como disco oral, e tentáculos nas extremidades, que auxiliam na captura de alimento.

O estado inicial do pólipó apresentado na figura 23A possuía 3 tentáculos vestigiais e 141 μm de tamanho no primeiro dia. Na fase seguinte (Figura 23B), o pólipó desenvolveu-se, apresentando quatro tentáculos, com o início da formação do disco oral e apresentando um maior tamanho (189 μm). No segundo dia, o pólipó apresentou uma estrutura mais complexa com o disco oral praticamente desenvolvido e um maior tamanho (205 μm) já com 4 tentáculos nítidos.

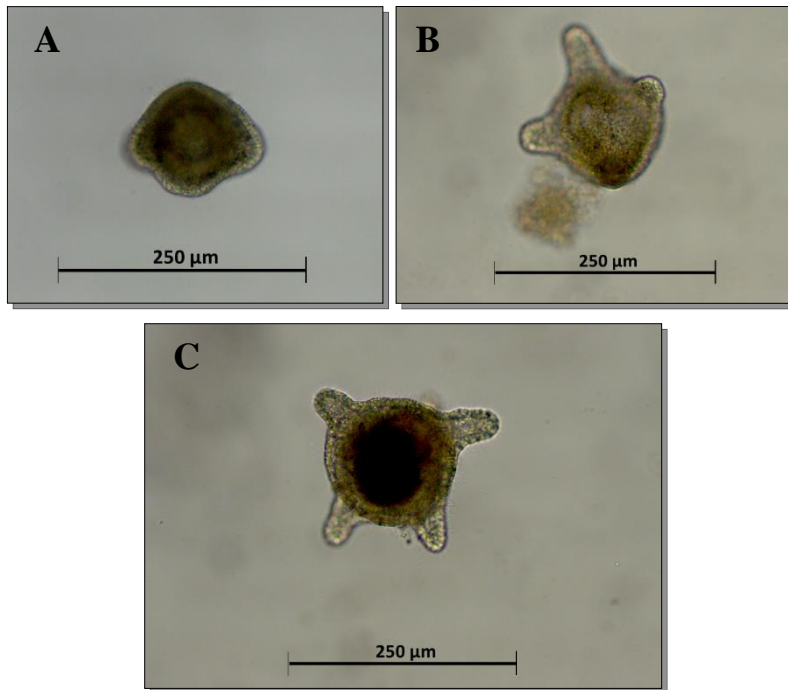


Figura 23- Observações a fresco dos estádios de maturação do pólipó de *Catostylus tagi*.

(A) Pólipó com 3 tentáculos-1 dia;

(B) Pólipó com 4 tentáculos-1 dia;

(C) Pólipó com 4 tentáculos-2 dias.

Escalas indicadas nas figuras.

3.6. Estudos preliminares sobre a sobrevivência dos pólipos

Após o assentamento das plânulas foi registrado diariamente o desenvolvimento das plânulas e dos pólipos ao longo do tempo nos diferentes substratos (Tabela 7). A 12 de Setembro havia 257 organismos, dos quais 176 plânulas e 81 pólipos. Sendo o primeiro dia de assentamento, a maioria dos organismos ainda se mantinha na forma de plânula. Ao longo dos dias observou-se uma maior transformação de plânula para pólipó até que no dia 20 de Setembro restavam 133 organismos, dos quais 42 plânulas e 91 pólipos.

Tabela 7- Dados de sobrevivência dos pólipos de *Catostylus tagi* ao longo dos primeiros 8 dias de assentamento.

Frascos*	1ºDia	2ºDia	3ºDia	4ºDia	5ºDia	8ºDia
	Pla/Pol**	Pla/Pol	Pla/Pol	Pla/Pol	Pla/Pol	Pla/Pol
10.4 Plástico	10/37	3/46	1/40	0/41	0/41	0/32
10.4 Madeira	2/36	0/35	0/35	0/28	0/28	0/28
10.4 Areia	20/2	15/2	8/4	6/6	6/6	6/6
10.4 Concha	14/6	16/6	5/4	3/7	3/7	3/6
10.2;10.5;10.7	21/0	20/0	8/0	7/1	7/1	3/3
2.1 15h46 Madeira	43/0	35/0	29/0	27/2	26/3	23/6
2.7 15h46	13/0	8/1	3/0	4/2	4/2	1/5
2.7 16h46	41/0	23/2	8/4	2/4	1/5	0/5
3.2; 3.3; 3.6; 3.7	12/0	9/0	9/0	9/0	9/0	6/0

*A identificação dos frascos baseou-se no nº do macho e fêmea utilizados. A denominação plástico, madeira, areia ou concha, refere o tipo de substrato. A indicação de hora aplicou-se no caso de repetição de ensaio. A denominação de vários pares indica os ensaios de fertilização que foram reunidos no mesmo frasco.

** Pla = plânula; Pol = pólipo.

A taxa de sobrevivência dos pólipos foi 51,7% nas condições de temperatura (19 ± 1 °C) e salinidade (34 ± 1).

A figura 24 mostra a percentagem de sobrevivência dos pólipos de *C. tagi* relativamente aos dias de assentamento da plânula, tendo em conta os resultados globais (I), os resultados por frasco (II), e os resultados segundo a presença de substrato (III); os resultados apresentados são a interpretação gráfica da tabela 10. Nos resultados globais (I), observou-se uma taxa elevada de sobrevivência de pólipos no segundo dia (~81%), uma queda acentuada no terceiro dia e uma tendência de estabilidade com alguma diminuição nos dias seguintes (~50%). A maior taxa de sobrevivência verificou-se nos recipientes que possuíam substrato, especificamente madeira e plástico, enquanto a menor taxa observou-se nos recipientes sem substrato (II e III). A areia e a concha foram os substratos com os resultados mais baixos, tendo este último uma taxa de sobrevivência abaixo dos 50 % nos últimos dias.

Observou-se que a preferência do substrato também aparenta regular a propagação da colonização dos pólipos.

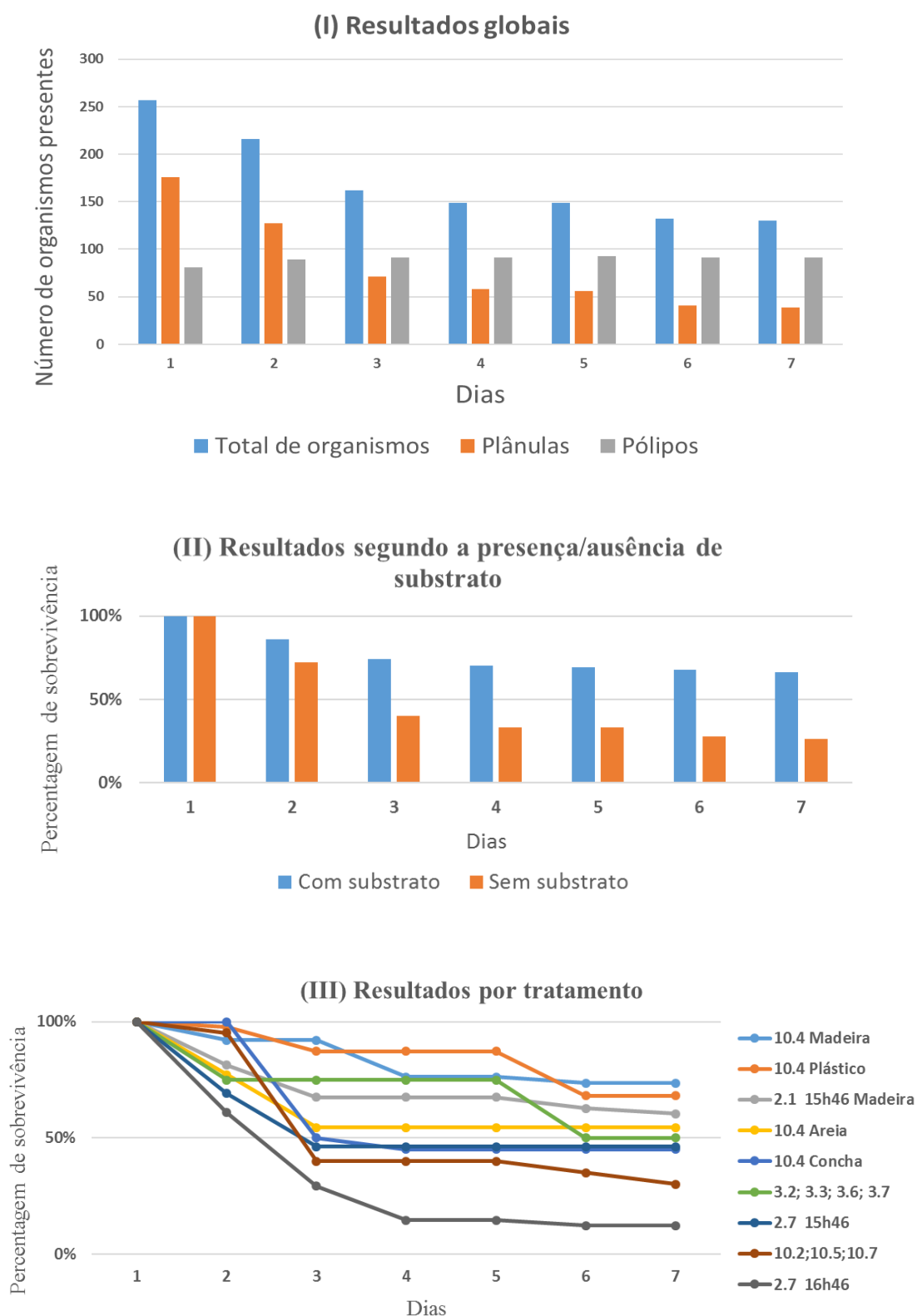


Figura 24- Acompanhamento da sobrevivência dos pólipos de *Catostylus tagi*. (I) Resultados globais; (II) Resultados por frasco; (III) Resultados segundo a presença de substrato.

Após 7 dias de assentamento, o pólipó (300 μm de altura e 500 μm de largura) apresentava uma estrutura muito complexa com o disco oral, o “pé” e talo completamente desenvolvidos (Figura 25). Para além disso, possuía um maior número de tentáculos (6-7) de maior tamanho e com capacidade de retração. Foi possível observar que os pólipos possuíam uma cor branca/transparente, mas após a ingestão dos ovos de mexilhão tornavam-se ligeiramente alaranjados e maiores. O bom desenvolvimento dos pólipos deveu-se às condições favoráveis para tal, ou seja, foi feito um grande controlo dos fatores termohalinos, da limpeza e principalmente da alimentação. Foi observada uma preferência alimentar para os ovos de mexilhão em relação aos rotíferos por parte dos organismos em cultivo.



Figura 25- Observação a fresco de pólipó de *Catostylus tagi* após 7 dias de assentamento, barra de escala 500 μm (foto por Raquel Lisboa).

4. Discussão

4.1. Morfologia das gónadas femininas e masculinas

A cavidade gastrovascular consiste numa estrutura de quatro extremos em forma de cruz, constituída por uma série de canais, que formam um sistema circulatório aberto à cavidade do estômago. As regiões periféricas, bolsas ou canais permitem que o alimento seja distribuído da cavidade do estômago na umbela, para os tentáculos e para os braços orais. As gónadas surgem da gastroderme e podem possuir várias colorações, castanho, verde e esbranquiçado (Figura 21A e B). Estruturas semelhantes foram observadas noutras espécies da ordem Rhizostomeae (Schiariti, 2008; Pitt & Kingsford, 2000).

A observação das gónadas da *C. tagi* permitiu confirmar que as fêmeas possuem ovócitos com forma esférica regular com uma parede celular bem definida, enquanto nos machos são observados folículos com forma alongada irregular (Figura 21 C e D). Estas formas assemelham-se às de outras Rhizostomae, como *L. lucerna* (Schiariti, 2008) e *C. mosaicus* (Pitt & Kingsford, 2000).

De acordo com os resultados referentes aos tamanhos das células sexuais registados, existe uma tendência para os ovócitos possuírem uma maior dimensão que os folículos espermáticos. Estes dados são corroborados com estudos de outros autores, os quais também observaram que os valores variam com o gênero e com a altura do ano (Pitt & Kingsford, 2000; Milisenda, 2016). No entanto, o número de amostras e o número de anos em que as medições foram feitas são insuficientes para tirar conclusões sobre variações nos tamanhos das gónadas da *C. tagi* entre Junho-Julho e Setembro.

Tal como foi observado em *C. tagi*, foram registadas medições semelhantes, para *L. lucerna* com ovócitos de 11 a 60 µm de diâmetro e folículos espermáticos entre 40 a 70 µm (Schiariti, 2008), e para *C. mosaicus* com ovócitos de 16 a 64 µm, e folículos espermáticos aproximadamente com 60 µm (Pitt & Kingsford, 2000).

Os resultados deste trabalho indicaram não haver relação entre a cor das gónadas, o diâmetro da umbela e o sexo dos animais, tal como já referido para outros cifozoários (Pitt & Kingsford, 2000; Schiariti, 2008). Mais recentemente, foi reportada a ocorrência de mais gónadas verdes entre os machos (88%) e mais gónadas castanhas entre as fêmeas (72%) de *L. lucerna*, embora esta tendência necessita de mais observações para que possa ser confirmada. (Schiariti *et al.*, 2012). No caso da espécie *C. tagi* não se verificou nenhuma tendência, sendo que os machos representaram mais de 50% dos organismos que exibiam tanto gónadas verdes como gónadas castanhas (Tabela 8). Por este motivo, a única forma confiável de caracterização sexual foi conseguida através de observação à lupa ou microscópio.

Em relação aos cifozoários mais semelhantes a *C. tagi*, a literatura refere uma percentagem de 57% de machos em recolhas aleatórias de *L. lucerna* (Schiariti, 2008) e percentagens próximas de 50% para *C. mosaicus* (Pitt & Kingsford, 2000).

4.2. Estudos preliminares sobre a histoquímica e a citoquímica das gónadas

Através da coloração azul ciano, método utilizado para detetar polissacarídeos ácidos nas gónadas corando-as de azul/ azul-esverdeado, foi possível verificar nas fotomicrografias realizadas as mucinas ácidas no exterior dos óvulos e dos folículos espermáticos. Estas observações sugerem que as mucinas não fazem parte da membrana perimetral destas células (Figura 23 A e B). Estas observações são concordantes com o estudo de Adonin (2009), que a partir de uma análise histoquímica com azul ciano observou que os ovócitos de *A. Aurita* continham polissacarídeos ácidos.

Pela coloração negro Sudão, os lípidos foram localizados apresentando uma coloração azul-escuro, sobretudo no interior das células segundo uma distribuição contínua (Figura 23 C e D). Isto sugere que os ovócitos possuem depósitos de lípidos, tendo como principal função, fornecer energia para o desenvolvimento do processo de gametogénese (Arcos-Ortega, 2015). Os lípidos estão depositados nos ovócitos e podem armazenar maior conteúdo de energia por unidade de volume do que as proteínas ou os hidratos de carbono (Milisenda, 2016). Consequentemente, os lípidos têm um efeito importante no desenvolvimento das gónadas e na sua fecundidade. Por exemplo, nos corais foi observado que o volume de ovócitos e de espermatozóides produzidos são positivamente correlacionados com o conteúdo lipídico (Viladrich *et al.*, 2017).

Com a coloração de Von Kossa, detetou-se a presença de depósitos de cálcio, numa distribuição descontínua, dentro e fora das células (Figura 23 E e F). O cálcio desempenha um papel fundamental durante a fertilização nas interações entre células e desencadeia, por exemplo, a formação de uma membrana de fertilização para prevenir a polispermia (Dehsari, 2017). Para além disso, auxilia o crescimento e a ativação do ovócito e o desenvolvimento folicular e embrionário. Na maioria das espécies, o espermatozóide tem um papel significativo no desencadeamento do aumento da concentração de cálcio no ovócito (Dehsari, 2017).

4.3. Estádios de gametogénese, ovogénese e espermatogénese

Como já foi referido a informação relativa à reprodução e seus constituintes da *C. tagi* é muito escassa, por este motivo os resultados podem apenas ser comparados com outras espécies, nomeadamente, *C. mosaicus*, *L. lucerna* e *Nemopilema nomurai*, uma vez estas possuem muitas características morfológicas e genéticas semelhantes à espécie em estudo.

No presente estudo foi possível observar ovócitos de várias fases de desenvolvimento ao longo da gastroderme, o que leva a afirmar que as fêmeas desta espécie possuem um ciclo reprodutor esperado, semelhante ao observado para outras espécies próximas e estas observações são concordantes com os resultados de outros autores, tais como: Ohtsu (2007) e Strathmann (2017), que descreveram uma morfologia do órgão genital feminino semelhante para *N. nomurai*, assim como Pitt & Kingsford para *C. mosaicus* (2000) e Schiariti (2008) para *L. lucerna*.

Foram observados ovócitos no exterior da gastroderme, o que leva a assumir que estes estariam prontos a serem libertados e fecundados pelos espermatozoides. Arai (2009) propôs que a fertilização pode ocorrer dentro do ovário, no entanto, sempre se assumiu que os ovócitos completam o seu desenvolvimento fora da gônada, seja na cavidade gástrica, canais dos braços da boca ou na água circundante. Esta hipótese é apoiada pelo estudo de Schiariti *et al.* (2012), em que foram observados ovócitos de *L. lucerna* extrudidos através de uma abertura na gastroderme no ponto em que estavam em contato com os trofócitos.

Existem dois tipos de ovogênese entre as ordens dos cifozoários. Nas espécies das ordens Rhizostomeae e Semaestomeae, os ovócitos desenvolvem-se com ligação aos trofócitos. No entanto, nas espécies da ordem Coronatae isso não acontece, uma vez que os ovócitos se desenvolvem livremente na mesogleia (Pitt & Kingsford, 2000). O processo de desenvolvimento de *C. tagi* corresponde às características das espécies da ordem Rhizostomeae, ordem a que pertence a espécie em estudo (Pitt, 2000) pois os ovócitos permanecem conectados à gastroderme pelos trofócitos durante o desenvolvimento.

Apesar de ser um processo biológico de enorme importância, a espermatogênese não tem sido estudada de forma sistemática e consistente em comparação com a ovogênese. Tal como as outras espécies da ordem Rhizostomeae, a espermatogênese em *C. tagi* ocorre dentro de folículos espermáticos que se formam de invaginações do epitélio germinal testicular. Para além dos folículos, visualizaram-se certas estruturas nas extremidades da gastroderme, sendo que estas permitiram que os gametas que tinham sido libertados pelos folículos espermáticos pudessem sair para o exterior e procurar ovócitos para fecundar. Esta observação é corroborada pelo estudo de Pitt & Kingsford (2000), no qual estes autores também observaram a libertação dos espermatozoides de *C. mosaicus* numa estrutura afastada do folículo espermático.

O processo da espermatogênese, assim como a morfologia e constituição do folículo espermático observados neste trabalho, foram semelhantes aos descritos por outros autores (Pitt & Kingsford, 2000; Schiariti, 2008; Strathmann, 2017).

Foram observados folículos espermáticos em vários estádios de desenvolvimento, os quais apresentavam uma estrutura mais compacta ainda com os espermatozoides e outros aparentavam uma estrutura mais vazia estão num estado de maturação mais avançado, em que já libertaram os gâmetas. Os gâmetas femininos também apresentaram vários estádios de desenvolvimento. Estas observações são consistentes com o estudo de Schiariti *et al.* (2012), no qual é referido que a gametogênese é um processo assíncrono porque os gâmetas de várias fases de desenvolvimento ocorrem simultaneamente em ambos os sexos.

4.4. Observações por microscopia eletrónica de varrimento, SEM

A microscopia eletrónica de varrimento, tal como os testes histológicos e as observações a fresco, revelaram que esta espécie possui ovócitos arredondados e folículos espermáticos retangulares. No entanto, esta análise permitiu ainda uma visualização mais pormenorizada e tridimensionalizada das gónadas e da morfologia exterior dos ovócitos e folículos. Para além disso, após várias observações, foi possível determinar que o formaldeído era o fixador que permitia uma melhor visualização das amostras e, deste modo estas foram selecionadas para utilização em SEM.

As medições dos ovócitos e dos folículos espermáticos nas colorações histológicas e em SEM apresentaram resultados ligeiramente superiores, que os observados nas medições com os fixadores. As diferenças de tamanho observadas podem estar relacionadas com os tratamentos histológicos, aos quais foram submetidas as gónadas uma vez que estes podem alterar um pouco o seu tamanho real. Por exemplo, no processo histológico, o fixador pode produzir uma série de mudanças nos tecidos na etapa aquosa. Estes incluem a diminuição, aumento e endurecimento de vários componentes. Apesar desses efeitos iniciais, os tecidos também sofrem alterações durante o processamento quando são colocados num ambiente não aquoso (Eltoum *et al.*, 2001). Para além disso, o fixador utilizado pode influenciar a estrutura dos elementos e como irão corar com vários reagentes histoquímicos e imuno-histoquímicos (Kuhlmann *et al.*, 2009).

4.5. Ensaio de fertilização *in vitro*

O processo de evolução desde o ovócito fertilizado até um pólipo com 4 tentáculos em estado avançado demorou no total 72 h. Ohtsu (2007) e Schiariti (2008) descreveram um processo muito semelhante ao observado neste trabalho, porém, o processo de fertilização *in vitro* de *N. nomurai* demorou entre 96 a 120h e o de *L. lucerna* demorou entre 72 a 144h, dependendo do tempo de incubação. A eficácia e a rapidez da fertilização de *C. tagi* registadas no presente estudo podem ter sido devidas à presença de condições favoráveis constantes ao longo do processo de desenvolvimento (temperatura, salinidade e agitação). Para além disso, o tempo de incubação foi diferente entre estas espécies. *Catostylus tagi* teve apenas 2h de incubação enquanto *N. nomurai* e *L. lucerna* tiveram entre 48 e 72h.

Relativamente às divisões e morfologia das células, as espécies *N. nomurai* (Ohtsu, 2007) e *L. lucerna* (Schiariti, 2008) apresentaram resultados semelhantes a *C. tagi*; no entanto, o tamanho das células é diferente, uma vez que *C. tagi* apresentou células de maior tamanho do que aquele registado para ambas as espécies anteriores. No início da divisão celular, *C. tagi* possuía células com corpos polares com 188 µm de diâmetro, desenvolvendo até aos estágios de mórula e de blástula com 214 µm. Nos mesmos estágios de desenvolvimento, *N. nomurai* possui células com cerca de 110 µm e 150 µm, respetivamente, e a espécie *L. lucerna* possui células entre 60 a 120 µm nos estágios iniciais e entre 95 e 200 µm nos estágios avançados. Estas diferenças morfológicas podem sugerir vantagens reprodutoras no momento da fecundação.

A resolução disponível não permitiu distinguir a presença nem a localização dos nematócistos na plânula, pelo que não foi possível verificar se os mesmos tinham uma distribuição homogénea ou se se localizavam numa região específica, tal como na espécie *Rhizostoma octopus* em que os nematócistos estão localizados maioritariamente na extremidade mais alargada do organismo (Holst, Sötje, Tiemann & Jarms, 2007).

Em relação ao tamanho de plânula apresentado pelas diferentes espécies, importa salientar a sua variação. Segundo Pitt (2000), as plânulas de *C. mosaicus* possuem um comprimento entre 100 a 130 µm e uma largura entre 50 a 65 µm. As plânulas de *L. lucerna* podem atingir maiores dimensões, entre 95 e 207 µm de comprimento e de 39 a 54 µm de largura (Schiariti, 2008). Estes valores são os que mais se assemelham com os valores registados para *C. tagi* (entre 287 e 338 µm de comprimento e 175 µm de largura).

Catostylus tagi apresentou pólipos desenvolvidos com uma parte superior do corpo em forma de cálice num talo curto e com uma superfície oral rodeada de um anel de tentáculos que auxiliam na captura de alimento. Foram observadas morfologias semelhante noutras espécies, já descritas, por exemplo, nos trabalhos de Holst (2012) e Helm (2018) em que estes autores apresentaram observações dos estádios iniciais de vários cifozoários. A forma e o tamanho do pólipos dependem de vários fatores, tais como o estado nutricional, a idade e a atividade de reprodução do pólipos, entre outros (Holst, 2012). A morfologia dos pólipos observados de *C. tagi* deveu-se a vários fatores durante todo o processo de fertilização. No momento em que se introduziu a alimentação, observou-se um aumento do tamanho dos pólipos e uma maior movimentação dos tentáculos, originando um desenvolvimento estrutural mais rápido.

A informação acerca da fertilização *in vitro* dos cifozoários ainda é um pouco escassa e os estudos que existem não explicam o processo detalhadamente (faltam etapas ou iniciam o processo a partir das plânulas). O processo de fertilização *in vitro* para ser bem-sucedido, depende de muitos fatores,

tais como a temperatura, salinidade, iluminação, agitação, entre outros. Por isso, é urgente trabalhar no desenvolvimento nos protocolos deste processo (Schiariti, 2008; Goldstein & Steiner, 2017).

4.6. Estudos preliminares sobre a sobrevivência dos pólipos

A taxa de sobrevivência dos pólipos foi de 51,7% nas condições de temperatura (19 ± 1 °C) e salinidade (34 ± 1). Estes resultados são concordantes com os de Amorim *et al.* (2018) que observaram que os pólipos que exibiam as maiores taxas de crescimento foram encontrados em áreas com salinidade média acima de 19 e a temperaturas entre 13,5 e 23,4 °C.

Vários autores observaram que a salinidade e a temperatura são os fatores ambientais com maior impacto na sobrevivência dos estádios de vida iniciais de cifozoários (Pitt & Kingsford, 2000; Purcell, 2005; Amorim *et al.*, 2018; Hočvar *et al.*, 2018). Em relação a *A. aurita*, Hočvar *et al.* (2018), observaram que a temperatura apresentou a correlação mais forte (positiva) com a densidade de pólipos, enquanto a tendência oposta (negativa) foi observada para a salinidade. A importância da temperatura deve-se ao facto de ser um fator primário na regulação, iniciação e sincronização da reprodução, e também pode desempenhar um papel importante na mudança entre os modos reprodutivos de muitos invertebrados aquáticos (Purcell, 2005). A salinidade pode causar alterações morfológicas nos estágios de vida iniciais da medusa, reduzindo a capacidade de captura do alimento dos pólipos e o assentamento das plânulas (Conley & Uye, 2015), isto terá consequências no tamanho, estrobilização, o seu desenvolvimento e pode provocar variações do volume populacional da medusa (Holst & Jarms 2010). No entanto, Amorim *et al.* (2018) e Goldstein & Steiner (2017) sugerem que os pólipos, como são sésseis e têm uma expectativa de vida mais longa que os outros estágios de vida, possuem uma maior tolerância fisiológica a fatores ecológicos.

A diminuição inicial da taxa de sobrevivência dos pólipos de *C. tagi* pode dever-se ao facto de algumas plânulas não terem conseguido assentar nos recipientes que não tinham substrato e em alguns dos substratos testados (areia e a concha), ou seja, as populações de pólipos poderão ser dependentes do substrato disponível, tal como descrito em relatos recentes referindo que as plânulas de *A. aurita* preferem fortemente locais com substratos para assentar, tais como rede, madeira e PVC do que locais sem substrato (Feng *et al.*, 2017; Hočvar *et al.*, 2018). Pólipos de outras espécies (*A. Aurita* e *R. octopus*) foram observados tanto em substratos naturais como em artificiais, havendo preferência por cloreto de polivinilo (PVC) e madeira (Goldstein & Steiner, 2017; Jin *et al.*, 2017; Hočvar *et al.*, 2018), tal como encontrado no presente trabalho.

A textura da superfície dos substratos pode determinar a escolha de assentamento das plânulas, tal como é sugerido por Hoover e Purcell (2009) e Feng *et al.* (2016). Estes autores observaram

maiores taxas de assentamento de plânulas de *Aurelia labiata* e *Aurelia Aurita* e em substratos mais rugosos e que evitam substratos que possuem produtos químicos anti-corrosivos e anti-incrustantes. A preferência pelos substratos pode variar ao longo do tempo devido à cobertura de biofilmes que modificam a rugosidade e enfraquecem os efeitos dos compostos químicos e podem afetar as escolhas de assentamento das plânulas. Holst e Jarms (2007) observaram que os biofilmes podem estar permanentemente presentes nos substratos e aumentar a força de fixação da superfície coberta por biofilmes e que as preferências para diferentes tipos de substratos variaram entre as espécies *Cyanea lamarckii*, *Chrysaora hysoscella*, *Cyanea capillata*, *Rhizostoma octopus* e *Aurelia aurita*. Observou-se que a preferência do substrato pode também regular a propagação da colonização dos pólipos em que, a taxa de sobrevivência diminui devido à competição intraespecífica por espaço e recursos alimentares, tal como sugerido por Jin *et al* (2017).

Após 7 dias de assentamento, o pólipo (300 µm de altura e 500 µm de largura) apresentava já uma estrutura muito complexa com o disco oral e o talo completamente desenvolvidos. Estruturas semelhantes de pólipos, tanto a nível morfológico como de dimensão, foram referidas por Holst (2012) em *R. octopus* e em *A. aurita* e por Helm (2018) em *C. chesapeakei*. A presença de vários tentáculos longos e o corpo de maior dimensão indicam um desenvolvimento estável do organismo. No entanto também foram observados alguns podocistos, que são considerados um estágio adormecido e são produzidos quando expostos a condições estressantes como temperatura extrema, salinidade, falta de oxigénio, fome ou contaminação bacteriana. Uma vez iniciada a produção de podocistos, a taxa de produção é dependente do estado nutricional do pólipo (Schiariti, 2008).

O tamanho e a saúde dos pólipos variam, dependendo das condições de cultura, uma vez que estes podem ser afetados pela temperatura, salinidade, oxigénio dissolvido e pela condição nutritiva (Arai, 2009; Purcell, 2005; Condon *et al.*, 2013). Portanto, o tamanho das estruturas morfológicas não deve ser usado como um método para distinguir espécies ao nível de pólipo, face à elevada variabilidade e plasticidade fenotípica registada para estes organismos (Graham & Bayha, 2008).

No presente estudo, foi ainda possível observar uma preferência alimentar pronunciada dos pólipos em cultivo por gónadas femininas de mexilhão maceradas em relação aos rotíferos. Esta tendência poderá dever-se ao facto de as gónadas possuírem um melhor e maior conteúdo nutricional, nomeadamente ao nível do seu perfil lipídico (Azpeitia *et al.*, 2016) e permite antever a possibilidade de desenvolvimento de dietas inertes formuladas especificamente para preencher os requisitos nutricionais dos organismos em estudo (Mills e Strathmann, 2017).

5. Considerações finais

Nesta tese, foram realizados os primeiros passos no estudo do ciclo de vida e caracterização sexual do cifozoário *Catostylus tagi*.

As observações iniciais às gónadas permitiram confirmar que existe diferenciação sexual, as fêmeas possuem ovócitos com forma esférica regular com uma parede celular bem definida enquanto nos machos são observados folículos com forma alongada irregular. Em resumo, o diâmetro dos ovócitos das fêmeas situou-se entre 17 e 44 μm , e a extremidade mais longa dos folículos espermáticos dos machos situou-se entre 11 e 40 μm .

Investigou-se a ocorrência de dimorfismo sexual, tanto em relação à cor das gónadas como em relação ao diâmetro da umbela e determinou-se o sexo, cor das gónadas e diâmetro de umbela em 73 exemplares. Os resultados deste trabalho indicaram não haver relação entre a cor das gónadas, o diâmetro da umbela e o sexo dos animais e, por este motivo, é possível afirmar que a única forma confiável de caracterização sexual é através da observação de tecido gonadal à lupa ou ao microscópio. Este estudo demonstrou que *C. tagi* possui morfologia semelhante às outras espécies da ordem Rhizostomae.

No presente estudo, a gametogénese e o potencial reprodutivo das gónadas de *C. tagi* foram investigados, integrando padrões morfométricos, histológicos (maturação gonadal e padrões de diferenciação dos gametas) e análises bioquímicas (colorações azul ciano, negro Sudão e Von Kossa). Através destes métodos, detetaram-se mucinas no exterior dos óvulos e dos folículos espermáticos e sugerem que as mucinas não fazem parte da membrana perimetral destas células e, também foram localizados lípidos sobretudo no interior das células segundo uma distribuição contínua. Para além disso, detetou-se a presença de cálcio, em distribuição descontínua, dentro e fora das células.

Os padrões de reprodução sexual da espécie *C. tagi* podem ser alcançados definindo os estágios de maturação de cada medusa com base no estado de desenvolvimento dos gametas. As medusas sexualmente maduras podem ser detetadas pela presença de gametas totalmente desenvolvidos nas gónadas ou pela presença de folículos espermáticos vazios. Enquanto a primeira permite uma maior compreensão dos padrões de reprodução sexual de qualquer espécie, esta última constitui uma opção para não-reprodutores equivalente à busca de ovos fertilizados ou de plânulas para espécies de reprodutoras.

Neste trabalho realizou-se pela primeira vez o processo de fertilização *in vitro* e registaram-se as imagens dos momentos iniciais da divisão celular de um ovo fecundado e a taxa de sobrevivência dos organismos nos primeiros 8 dias de assentamento das plânulas em diversos substratos. O processo de fertilização demorou no total 72 h a partir do momento da fertilização, no qual o resultado final foi um pólipó com 4 tentáculos em estado avançado.

Após o assentamento das plânulas foi registado diariamente o desenvolvimento das plânulas e dos pólipos ao longo do tempo nos diferentes substratos. No primeiro dia de assentamento havia 257 organismos, dos quais 176 plânulas e 81 pólipos. A taxa de sobrevivência dos pólipos foi 51,7% nas condições de temperatura (19 ± 1 °C) e salinidade (34 ± 1). Para além disso, observou-se uma preferência das plânulas para assentar em substrato, nomeadamente plástico e madeira. Os resultados obtidos nesta tese sobre as preferências de assentamento das plânulas podem ajudar a encontrar as populações de pólipos no seu meio ambiente para futuros estudos sobre a sua ecologia.

Investigações adicionais sobre o estágio medusa também são necessárias para entender o crescente sucesso reprodutivo deste cifoário. Para além disso, os resultados demonstram que os estágios iniciais de desenvolvimento no ciclo de vida, as plânulas e os pólipos, podem ter um papel fundamental no aparecimento de *blooms* desta espécie.

A continuação dos estudos aponta para a determinação das condições de sobrevivência dos organismos a médio e longo prazo, tanto na forma de podocisto como em pólipó. Para a compreensão do ciclo de vida da *C. tagi*, é igualmente fundamental iniciar a investigação das condições de estrobilação e de evolução para o estágio medusa.

Como o interesse pelas medusas, nomeadamente *C. tagi*, tem aumentado nos últimos anos, devido às suas características nutricionais como fonte de alimento para os seres humanos e as características químicas para a área farmacêutica, é cada vez mais importante saber o ciclo de vida da espécie para que seja possível reproduzir esse processo em cativeiro, de forma a investigar sem os problemas da sazonalidade desta espécie.

6. Bibliografia

- Adonin, L. S., Podgornaya, O. I., Matveev, I. V., & Shaposhnikova, T. G. (2009). Plate in the zone of oocyte and germinal epithelium contact in Scyphomedusa Aurelia aurita binds antibodies to ZP-domain protein mesoglein. *Cell and Tissue Biology*, 3(3), 283-288.
- Amorim, K., Mattmüller, R. M., Algueró-Muñiz, M., & Meunier, C. L. (2018). Winter river discharge may affect summer estuarine jellyfish blooms. *Marine Ecology Progress Series*.
- Arai, M. N. (2009). The potential importance of podocysts to the formation of scyphozoan blooms: a review. *Hydrobiologia*, 616(1), 241.
- Arai, M. N. (2012). *A functional biology of Scyphozoa*. Springer Science & Business Media.
- Arcos-Ortega, F. G., León-Hing, S. J. S., Rodríguez-Jaramillo, C., Burgos-Aceves, M. A., Giffard-Mena, I., & García-Esquivel, Z. (2015). Biochemical and histochemical changes associated with gonad development of the Cortez geoduck, *Panopea globosa* (Dall 1898), from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 34(1), 71-80.
- Aubert, A., Antajan, E., Lynam, C., Pitois, S., Pliru, A., Vaz, S., & Thibault, D. (2018). No more reason for ignoring gelatinous zooplankton in ecosystem assessment and marine management: Concrete cost-effective methodology during routine fishery trawl surveys. *Marine Policy*, 89, 100-108.
- Azpeitia, K., Ferrer, L., Revilla, M., Pagaldai, J., & Mendiola, D. (2016). Growth, biochemical profile, and fatty acid composition of mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.) cultured in the open ocean of the Bay of Biscay (northern Spain). *Aquaculture*, 454, 95-108.
- Bary, H. A. (1879). *Die Erscheinung der Symbiose: Vortrag*. Verlag von Karl J. Trübner.
- Bayha, K. M., Dawson, M. N., Collins, A. G., Barbeitos, M. S., & Haddock, S. H. (2010). Evolutionary relationships among scyphozoan jellyfish families based on complete taxon sampling and phylogenetic analyses of 18S and 28S ribosomal DNA.
- Boero, F., Bouillon, J., Gravili, C., Miglietta, M. P., Parsons, T., & Piraino, S. (2008). Gelatinous plankton: irregularities rule the world (sometimes). *Marine Ecology Progress Series*, 356, 299-310.
- Brotz, L. (2016). *Jellyfish fisheries of the world* (Doctoral dissertation, University of British Columbia).
- Cabral, H., & Costa, M. J. (1999). Differential use of nursery areas within the Tagus estuary by sympatric soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environmental Biology of Fishes*, 56(4), 389-397.
- Calejo, M. T. R. (2009). *Colagénio da Catostylus tagi como matriz polimérica destinada à veiculação de fármacos proteicos* (Doctoral dissertation).
- Cardona, L., De Quevedo, I. Á., Borrell, A., & Aguilar, A. (2012). Massive consumption of gelatinous plankton by Mediterranean apex predators. *PloS one*, 7(3), e31329.
- Condon, R. H., Duarte, C. M., Pitt, K. A., Robinson, K. L., Lucas, C. H., Sutherland, K. R., ... & Uye, S. I. (2013). Recurrent jellyfish blooms are a consequence of global oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(3), 1000-1005.
- Conley, K., & Uye, S. I. (2015). Effects of hyposalinity on survival and settlement of moon jellyfish (*Aurelia aurita*) planulae. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 462, 14-19.
- Costa, M.J., 1999. O estuário do Tejo. Edições Cotovia, Lisboa, Portugal.

- Costello, M. J., Bouchet, P., Emblow, C. S., & Legakis, A. (2006). European marine biodiversity inventory and taxonomic resources: state of the art and gaps in knowledge. *Marine Ecology Progress Series*, 316, 257-268.
- Costello, M. J., Emblow, C., & White, R. J. (2001). European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification.
- Dehsari, A. G. (2017). *Regulation of Subcellular Calcium During Fish Gametogenesis*. Faculty of Fisheries and Protection of Waters, University of South Bohemia in České Budějovice.
- Diaz Briz, L., Sánchez, F., Marí, N., Mianzan, H., & Genzano, G. (2017). Gelatinous zooplankton (ctenophores, salps and medusae): an important food resource of fishes in the temperate SW Atlantic Ocean. *Marine Biology Research*, 13(6), 630-644.
- Doyle, T. K., De Haas, H., Cotton, D., Dorschel, B., Cummins, V., Houghton, J. D., ... & Hays, G. C. (2008). Widespread occurrence of the jellyfish *Pelagia noctiluca* in Irish coastal and shelf waters. *Journal of Plankton Research*, 30(8), 963-968.
- Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R. B., & Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *Journal of Histotechnology*, 24(3), 173-190.
- Feng, S., Lin, J., Sun, S., & Zhang, F. (2017). Artificial substrates preference for proliferation and immigration in *Aurelia aurita* (sl) polyps. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(1), 153-162.
- Goldstein, J., & Steiner, U. K. (2017). Ecological and demographic drivers of jellyfish blooms. *bioRxiv*, 102814.
- Graham, W. M., & Bayha, K. M. (2008). Biological invasions by marine jellyfish. In *Biological invasions* (pp. 239-255). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Graham, W. M., Gelcich, S., Robinson, K. L., Duarte, C. M., Brotz, L., Purcell, J. E., ... & Pitt, K. A. (2014). Linking human well-being and jellyfish: ecosystem services, impacts, and societal responses. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(9), 515-523.
- Grawunder, D., Hambleton, E. A., Bucher, M., Wolfowicz, I., Bechtoldt, N., & Guse, A. (2015). Induction of Gametogenesis in the Cnidarian Endosymbiosis Model *Aiptasia* sp. *Scientific reports*, 5, 15677.
- Haeckel, E. (1869). Ueber die Crambessiden, eine neue Meduse-Familie aus der Rhizostomeen gruppe. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 19, 509-537.
- Haeckel, E. (1880). Das System der Medusen. I, 2: System der Acraspeden: 361-672. *Gustav Fischer, Jena*.
- Hamner, W. M. (1995). Sensory ecology of scyphomedusae. *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 26, 101-118.
- He, J., Zheng, L., Zhang, W., & Lin, Y. (2015). Life cycle reversal in *Aurelia* sp. 1 (Cnidaria, Scyphozoa). *PloS one*, 10(12), e0145314.
- Helm, R. R. (2018). Evolution and development of scyphozoan jellyfish. *Biological Reviews*, 93, 1228-1250.
- Hočvar, S., Malej, A., Boldin, B., & Purcell, J. E. (2018). Seasonal fluctuations in population dynamics of *Aurelia aurita* polyps in situ with a modelling perspective. *Marine Ecology Progress Series*, 591, 155-166.
- Holst, S. (2012). Morphology and development of benthic and pelagic life stages of North Sea jellyfish (Scyphozoa, Cnidaria) with special emphasis on the identification of ephyra stages. *Marine Biology*, 159(12), 2707-2722.

- Holst, S., & Jarms, G. (2010). Effects of low salinity on settlement and strobilation of scyphozoa (Cnidaria): Is the lion's mane *Cyanea capillata* (L.) able to reproduce in the brackish Baltic Sea?. In *Jellyfish Blooms: New Problems and Solutions*(pp. 53-68). Springer, Dordrecht.g
- Holst, S., Sötje, I., Tiemann, H., & Jarms, G. (2007). Life cycle of the rhizostome jellyfish *Rhizostoma octopus* (L.) (Scyphozoa, Rhizostomeae), with studies on cnidocysts and statoliths. *Marine Biology*, 151(5), 1695-1710.
- Jin, H. S., Han, D., Kim, J. H., Shin, H. J., Yoon, Y. H., & Han, C. H. (2017). Simulations of the Population Dynamics of Jellyfish Polyps Living on Artificial Substrates in Coastal Areas. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 33(1), 43-50.
- Kayal, E., Bastian, B., Pankey, M. S., Ohdera, A., Medina, M., Plachetzki, D. C., ... & Ryan, J. F. (2017). Comprehensive phylogenomic analyses resolve cnidarian relationships and the origins of key organismal traits. *PeerJ Preprints*.
- Khong, N. M., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., & Nishikawa, J. (2016). Nutritional composition and total collagen content of three commercially important edible jellyfish. *Food chemistry*, 196, 953-960.
- Kuhlmann, W. D. (2009). Fixation of biological specimens.
- Lincoln, R. J., & Sheals, J. G. (1979). *Invertebrate animals: collection and preservation* (pp. 48-50). London: British Museum (Natural History).
- Lucas, C. H. (2001). Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia*, 451(1-3), 229-246.
- Milisenda, G., Martinez-Quintana, A., Fuentes, V. L., Bosch-Belmar, M., Aglieri, G., Boero, F., & Piraino, S. (2016). Reproductive and bloom patterns of Pelagia noctiluca in the Strait of Messina, Italy. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*.
- Mills, C. E. (2001). Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? *Hydrobiologia*, 451(1), 55-68.
- Morais Z. & Parracho T. (2014). What was the cause of skin rashes on Carcavelos and Costa da Caparica beaches last summer? *Rev Saúde Pública* 48:268. Disponível em <http://www.fsp.usp.br/rsp/wp-content/uploads/2017/08/en-RSPv048n.esp-congresso-book-p7.pdf> Acessado em Março 2018.
- Morais, Z. & Soeiro, R. (2015). Extractos de medusa para inibição da actividade da enzima conversora da angiotensina. PT106423. *Boletim da Propriedade Industrial* 11 Maio 2015, p 71. Lisboa.
- Morais, Z. B., Pintão, A. M., Costa, I. M., Calejo, M. T., Bandarra, N. M., & Abreu, P. (2009). Composition and in vitro antioxidant effects of jellyfish *Catostylus tagi* from Sado Estuary (SW Portugal). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 90-107.
- Morais, Z., Schiariti, A. & Morandini, A. (2017). An interdisciplinary approach to the scyphozoans of the Atlantic Ocean. Chapter 5 in *Jellyfish: Ecology, Distribution Patterns and Human Interactions*. Editor Mariottini, G.L., Nova Science Publishers, Incorporated, New York. ISBN 9781634856881.
- Ohtsu, K., Kawahara, M., Ikeda, H., & Uye, S. I. (2007). Experimental induction of gonadal maturation and spawning in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology*, 152(3), 667-676.
- Parracho, T. D. C. T. (2013). *Estudos histoquímicos e genéticos sobre a Medusa Catostylus Tagi:(I) caracterização morfológica e histoquímica de componentes estruturais dos nematocistos;(II) Comparação*

das regiões 18S, 28S e ITS1 do rDNA de exemplares do Tejo e Sado. Master dissertation, Escola Superior de Saúde Egas Moniz.

Parracho, T., & Morais, Z. (2015). *Catostylus tagi*: partial rDNA sequencing and characterisation of nematocyte structures using two improvements in jellyfish sample preparation. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21(1), 40.

Patwa, A., Thiéry, A., Lombard, F., Lilley, M. K., Boisset, C., Bramard, J. F., ... & Barthélémy, P. (2015). Accumulation of nanoparticles in “jellyfish” mucus: a bio-inspired route to decontamination of nano-waste. *Scientific reports*, 5, 11387.

Pitt, K. A., & Kingsford, M. J. (2000). Reproductive biology of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus* (Rhizostomeae). *Marine Biology*, 137(5-6), 791-799.

Pitt, K. A., Budarf, A. C., Browne, J. G., & Condon, R. H. (2014). Bloom and bust: why do blooms of jellyfish collapse?. In *Jellyfish blooms* (pp. 79-103). Springer, Dordrecht.

Pradeu, T. (2011). A Mixed Self: The Role of Symbiosis in Development. *Biological Theory*, 6, 80–88.

Purcell, J. E. (2005). Climate effects on formation of jellyfish and ctenophore blooms: a review. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85(3), 461-476.

Purcell, J. E., Hoover, R. A., & Schwarck, N. T. (2009). Interannual variation of strobilation by the scyphozoan *Aurelia labiata* in relation to polyp density, temperature, salinity, and light conditions in situ. *Marine Ecology Progress Series*, 375, 139-149.

Raikova, E. V., & Raikova, O. I. (2016). Nervous system immunohistochemistry of the parasitic cnidarian *Polypodium hydriforme* at its free-living stage. *Zoology*, 119(2), 143-152.

Raposo, A., Coimbra, A., Amaral, L., Gonçalves, A., & Morais, Z. (2018). Eating jellyfish; safety, chemical and sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

Raskoff, K. A., Sommer, F. A., Hamner, W. M., & Cross, K. M. (2003). Collection and culture techniques for gelatinous zooplankton. *The Biological Bulletin*, 204(1), 68-80.

Richardson, A. J., Bakun, A., Hays, G. C., & Gibbons, M. J. (2009). The jellyfish joyride: causes, consequences and management responses to a more gelatinous future. *Trends in ecology & evolution*, 24(6), 312-322.

Santos, G., Nogueira, I., & Morais, Z. (2017, June). The statoliths of *Catostylus tagi*, chemical characterization by energy dispersive X-ray spectroscopy. In *2nd International Congress of CiiEM: “Translational Research and Innovation in Human in health Sciences”*.

Scanes, C. G. (2018). Invertebrates and Their Use by Humans. Chapter 8 in *Animals and Human Society*, pag 191. Editors Scanes & Toukhsati, Academic Press, Milwaukee. ISBN 9780128052471.

Schiariti, A., Christiansen, E., Morandini, A. C., da Silveira, F. L., Giberto, D. A., & Mianzan, H. W. (2012). Reproductive biology of *Lychnorhiza lucerna* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae): individual traits related to sexual reproduction. *Marine Biology Research*, 8(3), 255-264.

Schiariti, A., Kawahara, M., Uye, S., & Mianzan, H. W. (2008). Life cycle of the jellyfish *Lychnorhiza lucerna* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology*, 156(1), 1.

Stiasny, G. (1922). Ergebnisse der Nachuntersuchung einiger Rhizostomeen-Typen Haeckel's und Chun's aus dem Zoologischen Museum in Hamburg. *Zoologische Mededelingen*, 7(4), 41-60.

Strathmann, M. F. (2017). *Reproduction and development of marine invertebrates of the northern Pacific coast: data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae*. University of Washington Press.

Sweetman, A. K., & Chapman, A. (2015). First assessment of flux rates of jellyfish carcasses (jelly-falls) to the benthos reveals the importance of gelatinous material for biological C-cycling in jellyfish-dominated ecosystems. *Frontiers in Marine Science*, 2, 47.

Thiel, M. E. (1978). Die postephyrale Entwicklung des Gastrovascularsystems der Rhizostomida nebst Ergänzungen und Berichtigungen zu den Stiasnyschen Typen dieser Entwicklung, zugleich ein Zeugnis für das Haeckelsche biogenetische Grundgesetz. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 16(4), 267-289.

Viladrich, N., Bramanti, L., Tsounis, G., Chocarro, B., Martínez-Quitana, A., Ambroso, S., ... & Rossi, S. (2016). Variation in lipid and free fatty acid content during spawning in two temperate octocorals with different reproductive strategies: surface versus internal brooder. *Coral reefs*, 35(3), 1033-1045.

Vinagre, C., Costa, M. J., & Dunne, J. A. (2017). Effect of spatial scale on the network properties of estuarine food webs. *Ecological Complexity*, 29, 87-92.

Vinagre, C., Máguas, C., Cabral, H. N., & Costa, M. J. (2012). Food web structure of the coastal area adjacent to the Tagus estuary revealed by stable isotope analysis. *Journal of sea research*, 67(1), 21-26.

Anexos

Anexo 1- Preparação das soluções:

- 1) Bouin: 75 mL de solução saturada de ácido pícrico, 25 mL de solução aquosa de formaldeído a 40%, 5 mL de ácido acético glacial.
- 2) Gendre: os mesmos componentes de Bouin, sendo etanol o solvente do ácido pícrico.
- 3) Hollande: os mesmos componentes de Bouin, acrescido de 2,5g de acetato de cobre.
- 4) Etanol 70%: 70 mL de etanol absoluto em 100 mL totais, com água desionizada.
- 5) Formaldeído 4%: 10 mL formaldeído a 40% em 100 mL totais, com água desionizada.

Anexo 2- Observações adicionais

A continuação das observações das gónadas de *C. tagi* por SEM expôs algumas células com paredes danificadas (Figura 26A) e pelo menos dois outros organismos, um crustáceo (Figura 26B) e um cnidário (Figura 26C).

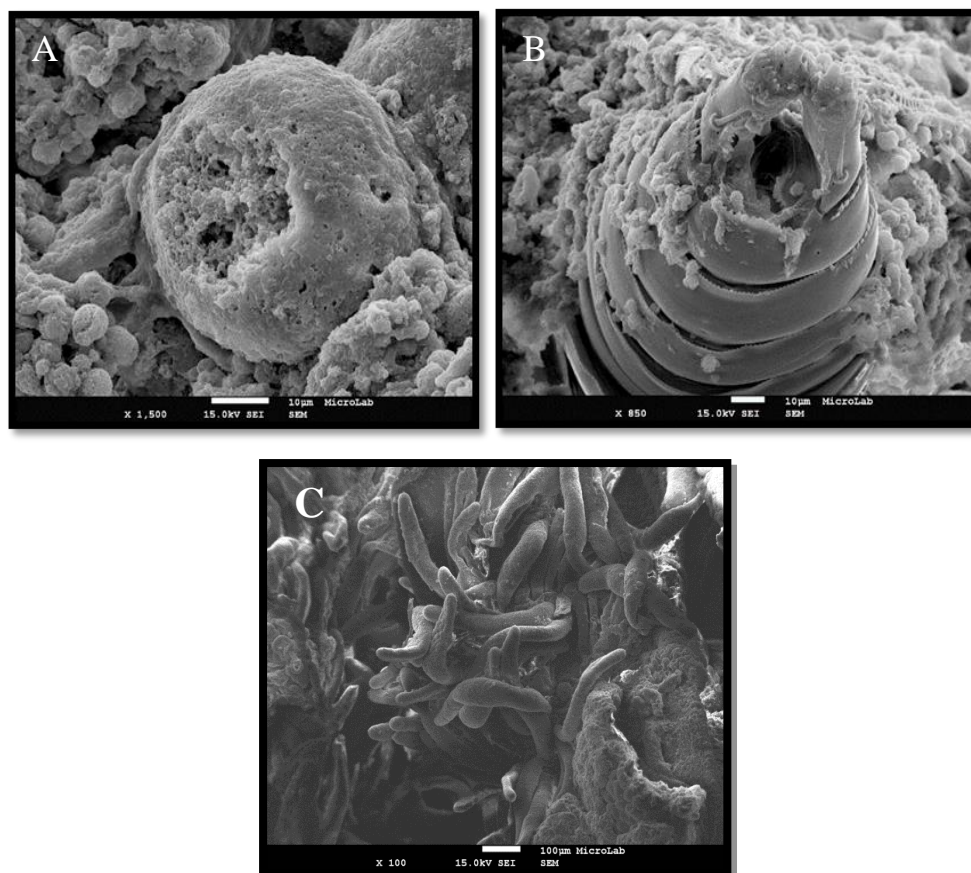


Figura 26- Observações SEM das gónadas *C. tagi*. (A) Ovócito danificado; (B) Ovócito com crustáceo não identificado; (C) Folículo espermático com cnidário não identificado (fotomicrografias I. Nogueira).

O crustáceo observado poderá ser alguma espécie do género *Libinia*, tal como referido noutros estudos. O cnidário da figura 26C tem semelhanças morfológicas com *Polypodium hydriforme*, conhecido por parasitar as gónadas de peixes da família Acipenseridae, comumente denominados esturjões (Raikova, 2016). Como ambos *C. tagi* e os esturjões são animais estuarinos, aventou-se a possibilidade de eles compartilharem o mesmo parasita. Neste sentido, contactou-se a professora Ekaterina Raikova, especialista em esturjões, para que desse o seu parecer.

Foram observados organismos a interagir com *C. tagi* (Figura 27). Na figura 27A estão representadas larvas de carapau (*Trachurus trachurus*), que possuem uma relação de comensalismo com a medusa, em que procuram abrigo e proteção na estrutura da mesma. Os investigadores do CiiEM que estudam *C. tagi* referiram que a ocorrência de carapaus é comum e verificou-se em todos os 13 anos de recolha, chegando a encontrar-se uma dezena de carapaus na mesma medusa. Também referiram que a ocorrência de umbelas com marcas de bicadas de aves marinhas é muito comum e recorrente ao longo dos anos.

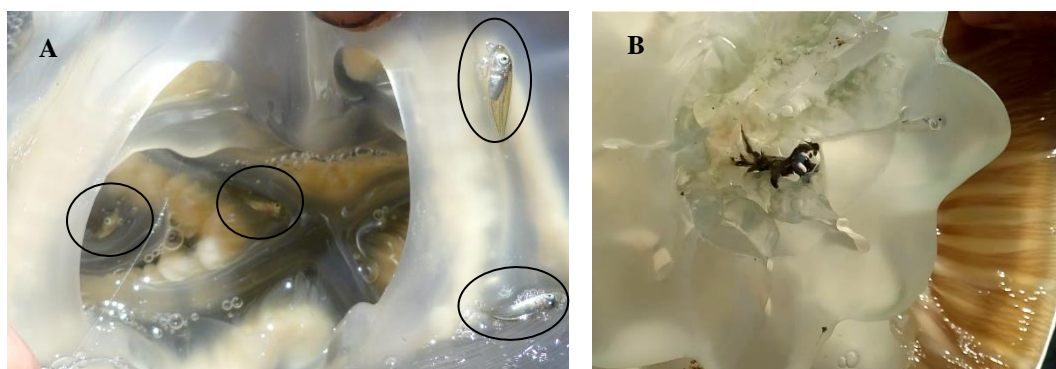


Figura 27- Observações *in situ* de organismos com relações ecológicas a *C. tagi*. (A) Carapau, *Trachurus trachurus*; (B) Crustáceo, identificação em andamento.

Numa operação de recolha de amostras, foi observado um organismo no interior da zona das gónadas (Figura 27B). Após uma observação mais minuciosa foi possível determinar que se tratava de um crustáceo decápode majideo do sexo feminino (Figura 28). É possível que este organismo seja um predador de *C. tagi*, pois estava situado junto às gónadas e em laboratório alimentou-se das mesmas. A identificação taxonómica do organismo está ainda em curso, sendo necessário recorrer a métodos de códigos de barras moleculares, pois os caracteres morfológicos exibidos pelo organismo não permitem a sua classificação ao nível de género.

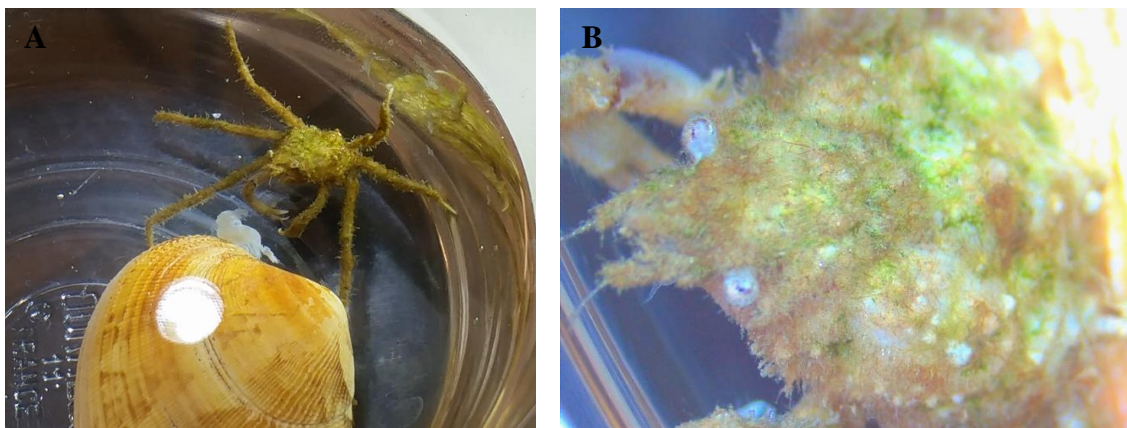




Figura 28- Crustáceo recolhido da gónada de *C. tagi*, em observação no laboratório da Egas Moniz, (A) Vista macroscópica; (B) Vista com a lupa Si9.

Anexo 3- Publicações associadas a este trabalho

II Jornadas Nacionais de Caracterização de Materiais, CP34, 24-26 Janeiro 2017, Aveiro



PRELIMINARY SEM STUDIES ON NORMAL AND ALTERED GONADS OF CATOSTYLUS TAGI

II Jornadas Nacionais de Caracterização de Materiais
January 24-26, 2017

Raquel Lisboa^{1,2}, Isabel Nogueira³, Fátima Gil⁴, Paulo Mascarenhas², Zilda Morais²

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro - Campus Universitário de Santiago, 3810-193 Aveiro
² CIiEM, Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior - Campus Universitário, Quinta da Granja, 2829 - 511 Monte de Caparica, Almada
³ MicroLab, Instituto Superior Técnico - Av. Rovisco Pais 1, 1049-001 Lisboa
⁴ Aquário Vasco da Gama - R. Direita do Dafundo, 1495-718 1495-154 Algés
raquelreislisboa@gmail.com

Introduction

It is known that according to the life stage, an interaction of organisms can change from mutualism to commensalism and vice-versa; even parasitism can be shared. Recent studies have shown a close interaction among jellyfish, fishes and other taxa [1].

Catostylus tagi (Fig.1), the sole European Catostylidae, is an edible Scyphozoa which occurs in summer at Tagus and Sado estuaries. Some aspects of its application in health sciences have already been studied [2].

To start the study of its life cycle, the characterization of gonads regarding size and sex were carried out by optical (OM) and electronic microscopies (SEM).



Fig. 1- *Catostylus tagi* (photo by R. Lisboa).

Methods

Eighty exemplars (61 males and 19 females) were collected in September 2016.

The gonads (Fig.2) were removed and placed in five fixative solvents (Hollande, Gendre, Bouin, ethanol and formaldehyde) to prevent tissue degradation.



Fig. 2- *C. tagi* gonads (photo by R. Lisboa).

SEM Preparation

Experiments were conducted by depositing the fixed gonads on a metal stub, in which a thin film of a conducting metal was sputtered. Samples were imaged with JEOL Field Emission Scanning Electron Microscope JSM-7001F [3].

Results

The intact cells of female (Fig.3A) were regular spheres with a mean diameter of 31 μm ($n = 400$) in September. In the same period, the healthy male cells (Fig.3B) were more abundant, with a somewhat irregular elongated shape and smaller (24 μm , $n = 400$).

No correlation was found between the sex and the colour of the gonad (green or brown or yellow).

The observations at the gonads of *C. tagi* by SEM exposed some cells with ruptured walls (Fig.3C) and at least two other organisms, a crustacean (Fig.3D) and a cnidarian (Fig.3E).

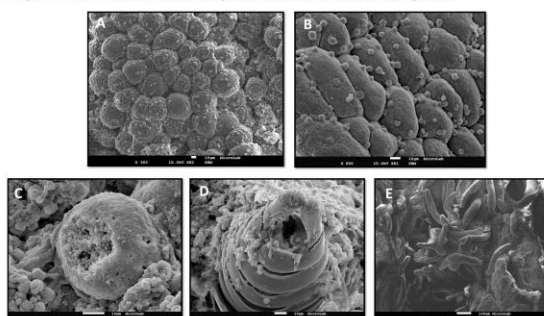


Fig. 3- SEM observations of *C. tagi* gonads; A- Female cells; B- Male cells; C- cell with ruptured wall; D- Crustacean organism; E- Cnidarian organism (photos by I. Nogueira).

Discussion

The crustacean organism observed could be *Hyperia gaudichaudii* (Fig.4), already mentioned in *C. mosaicus*, an Australian jellyfish, although without images available [4].

The cnidarian organism had morphological similarities with *Polypodium hydriforme* (Fig.5) which is known to parasite the gonads of fish belonging to the family Acipenseridae, commonly named sturgeons [5].

As both *C. tagi* and the sturgeons are estuarine animals, it is not absurd that they share the same parasite.



Fig. 4- *Hyperia gaudichaudii* [4].

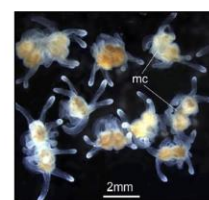


Fig. 5- *Polypodium hydriforme* [5].

Future Research

Genetic studies through amplification of genomic DNA (18S rDNA) of the organisms are now in progress.

References

- [1] Riascos, J. M., Vergara, M., Fajardo, J., Villegas, V., & Pacheco, A. S. *Journal of fish biology*, **2012** 81(5), 1686-1695.
- [2] Morais Z, Schiariti A & Morandini A. *Editors Mariottini GL, Nova Science Publishers*, **2017**.
- [3] Crucho, C. I., & Barros, M. T. (2015). *Polymer*, **68**, 41-46.
- [4] Browne, J. G. *Doctoral dissertation, Griffith University*, **2014**.
- [5] Raikova, E. V. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, **2008** 88(08), 1695-1702.

Acknowledgements

This work was supported by Egas Moniz Coop Ensino Superior crl, project EM-ZM 03/04

Raquel Lisboa^{1,2}, Paulo Mascarenhas², Fátima Gil³, Francisco Ruano⁴, Carina Ladeira⁵ and Zilda Morais²

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro; Portugal

² CiiEM, Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior, Almada, Portugal

³ Aquário Vasco da Gama, Algés, Portugal

⁴ Instituto Português do Mar e da Atmosfera, Algés, Portugal;

⁵ Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa – Instituto Politécnico de Lisboa (ESTeSL-IPL), Lisboa, Portugal.

raquelreislisboa@gmail.com

Introduction

Jellyfish has been proposed as a source in drug development to treat diseases such as arthritis and hypertension [1].

Catostylus tagi (Fig.1), the sole European Catostylidae, is an edible Scyphozoa which occurs in summer at Tagus and Sado estuaries. Some aspects of its application in health sciences have already been studied [2].

➤ This assay aimed to investigate its sexual differentiation (female, F; male, M) by morphological characteristics.

Methods

Forty specimens were randomly collected at Tagus estuary in September 2016 and brought to Egas Moniz laboratory (Fig. 2)

The macroscopic aspects of the gonads were compared with microscopic observation of fresh preparations and histological slides, stained by hematoxylin-eosin (H&E).



Fig. 2- *C. tagi* gonads (photo by R. Lisboa).



Fig. 1- *Catostylus tagi* (photo by R. Lisboa).

Results

Of the caught specimens, 28 were M and 12 F. An unequivocal relation between the colour of the gonad and the density of matter with the sex was not found.

F presented brown gonads more frequently than greenish (8/12) and lower density of matter more frequently than higher (9/12).

M were more frequently greenish (15/28) with higher density of matter (20/28).

Discussion & Conclusion

The *C. tagi* has differentiated sexes, however it's not possible to identify them externally.

These results are in agreement with other authors who found no safe way to distinguish sex but by microscopy [3].

References

- [1] Rocha J, Calado R, & Leal M. In: Springer Handbook of Marine Biotechnology. Berlin Heidelberg: Springer; 2015. p. 823-49.
- [2] Morais Z, Schiariti A & Morandini A. In: Jellyfish, Ecology, Distribution Patterns and Human Interactions. New York: Nova Science Publishers; 2017. p. 91-145.
- [3] Schiariti A. PhD Thesis. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 2008.

Acknowledgements

We thank the fishermen Vitor Reis and Olímpio Simões. This study was funded by Egas Moniz Coop Ensino Superior CRL, project EM-ZM 03/04

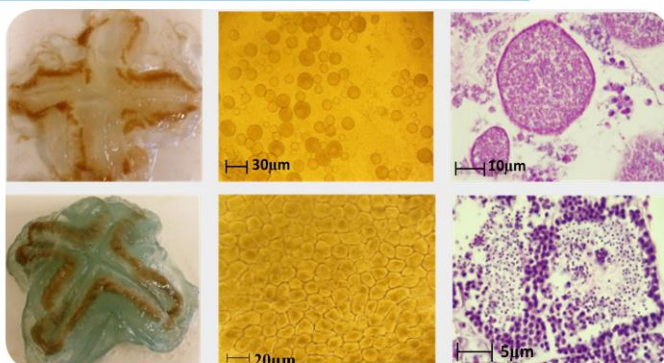


Figure 3. Representative specimens of F and M characteristics. Up: photograph of F gonad from a just captured live specimen; microphotograph of F gonad fresh sample (100x); microphotograph of F gonad after H&E staining (1000x). Down: M gonad, same procedures.

Ovocytes had a regular spherical shape with a well-defined cell wall, and a mean diameter of 31 µm (n = 400), in different development stages.

The spermatocytes were formed in a follicle with an irregular, smaller elongated shape (24 µm, n = 400) (Fig.3).

Catostylus tagi: survival and maintenance trials of planula and polyps

Raquel Lisboa^{1,2}, Fátima Gil³, Paulo Mascarenhas², Zilda Morais² and André Morandini^{4,5}

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro; Portugal; ² CiiEM, Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior, Almada, Portugal; ³ Aquário Vasco da Gama, Algués, Portugal, ⁴ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil; ⁵ Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo, Brazil.

raquelreislisboa@gmail.com

Introduction

- Besides the knowledge of life cycles in nature, the sustained use of aquatic biological resources also requires the development of know-how to reproduce and maintain them in captivity (1).
- The scyphozoan *Catostylus tagi*, native to the Tagus and Sado estuaries, has already shown applicability in the areas of gastronomy and drugs for humans and has potential to be used as food for aquaculture organisms (2).
- In this work we started to investigate the benthic life stages of *C. tagi* and their maintenance in laboratory.



Figure 1. *Catostylus tagi* (photo by R. Lisboa).

Materials and Methods

- In September 2017, gonads of 20 specimens of *C. tagi* (12 males and 8 females) were collected in the Tagus estuary.
 - Pairwise samples of male and female gonads were placed in containers with 80 mL of Tagus water and different substrate for *in vitro* fertilization.
- The settlement, growth and survival of the polyps were monitored daily with observations on the microscope.
 - Polyps were cultured under constant conditions of temperature (19 ± 1 °C) and salinity (34 ± 1 ‰) and kept in the dark to minimize the algae growth.
- When the polyps developed 6 tentacles, they were fed every 2 days, alternating between macerated female mussel gonads and rotifers supplied *ad libitum*.
 - Waste particles and food remnants were removed daily from the containers. Between 20-50% of the water in each container was replaced with filtered Tagus water after the polyps had been fed.



Figure 2. A: Containers where the *in vitro* fertilization process of *C. tagi* occurred; B: Monitoring the survival of *C. tagi* polyps in S9i microscope.

Results

- Polyp survival rate was high on the second day (~ 81%), but with a marked fall on the day after, and a trend for stability with some decrease on the following days (~ 50%) (Figure 3).
- The highest survival rate was observed in containers that had substrate, specifically wood and plastic.

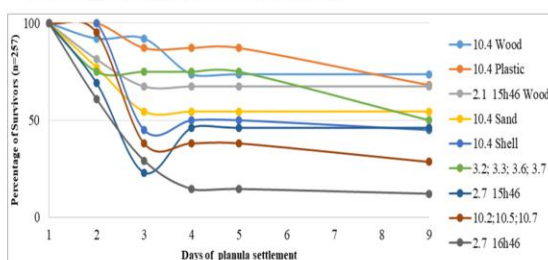


Figure 3. Rate of *C. tagi* polyps survival.



- The lowest rate was observed in containers without substrate.
- Sand and shell were the substrates with the lowest results, the latter having a survival rate below 50% in the last days.

Figure 4. *C. tagi* polyp observation after 7 days of settlement, 500 µm scale bar (photo R. Lisboa).

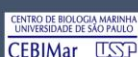
Discussion and Conclusions

- At the conditions of temperature and salinity used in this trial, statistical comparison confirmed that the survival rate of the polyps was significantly different in environments with and without substrate (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).
- Other authors observed similar rates of growth and survival in related species (3).

References

- Goldstein, J., & Steiner, U. K. (2017). Ecological and demographic drivers of jellyfish blooms. *bioRxiv*, 102814.
- Morais, Z., Schiariti, A. & Morandini, A. (2017). An interdisciplinary approach to the scyphozoans of the Atlantic Ocean. Chapter 5 in *Jellyfish: Ecology, Distribution Patterns and Human Interactions*. Editor Mariottini, G.L., Nova Science Publishers, Incorporated, New York.
- Amorim, K., Mattmüller, R. M., Algueró-Muñiz, M., & Meunier, C. L. (2018). Winter river discharge may affect summer estuarine jellyfish blooms. *Marine Ecology Progress Series*.

Acknowledgements: This study was funded by Egas Moniz Coop Ensino Superior CRL, project EM-ZM 03/04.



Catostylus tagi: *in vitro* fertilization and cell division

Raquel Lisboa^{1,2}, Fátima Gil³, Paulo Mascarenhas², Zilda Moraes² and André Morandini^{4,5}

¹ Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal; ² CiiEM, Egas Moniz Cooperativa de Ensino Superior, Almada, Portugal; ³ Aquário Vasco da Gama, Algés, Portugal; ⁴ Departamento de Zoologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Brazil; ⁵ Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo, Brazil.

raquelreislisboa@gmail.com

Introduction

- ❖ Scyphozoans (Cnidaria) are abundant and important members of many marine habitats, and have large impacts on human health and industry.
- ❖ The long-term survival of these populations depends on the development of benthic stages, which have gained considerable attention in recent years due to their impact on people and ecosystems [1].
- ❖ *Catostylus tagi* is an edible Scyphozoa which occurs in summer at Tagus and Sado estuaries. In view of its application in health sciences, some studies have already been started [2].



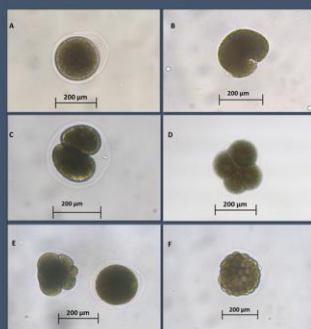
Figure 1. *Catostylus tagi* (photo by R. Lisboa).

Materials and Methods

- In September 2017, twenty specimens were randomly collected at Tagus estuary and the gonads were removed and brought to laboratory.
- In the Egas Moniz laboratory, samples of the gonads were removed from each organism.
 - Microscopy observations were used to identify the sex and to remove gastric filaments that could compromise the integrity of the gonads.
- To initiate the *in vitro* fertilization the samples of different males and females were placed in containers with 80 mL of Tagus water and most of them with substrate.

Results

- The process of development from the fertilized egg to a polyp with 4 tentacles in advanced stage took a total of 72 hours.



- It was observed that from the fertilized egg to the beginning of cell division only 6 hours passed.
- The formation of ~ 64 cells was completed in 15 hours.

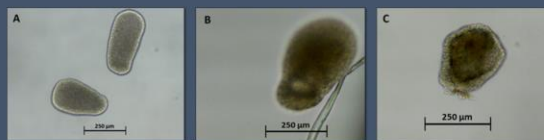


Figure 1. Observations of organisms resulting from the *in vitro* fertilization of *C. tagi*. (A) Planula; (B) In an advanced stage planula; (C) Newly settled polyp. Scales indicated in the figures.

Figure 2. Observations of cell divisions resulting from *in vitro* fertilization of *C. tagi*. (A) Fertilized egg with presence of polar bodies; (B) Onset of cell division; (C) Division into 2 cells; (D) Division into 4 cells; (E) Division into 8 cells; (F) Division into ~ 64 cells. Scales indicated in the figures.

- On the first day of settlement, 257 organisms were obtained, 176 of which were planulae and 81 polyps.

Discussion and Conclusions

- ❖ Other authors have observed a very similar process of *in vitro* fertilization, however slightly longer [3] [4].
- ❖ The effectiveness and speed of fertilization of *C. tagi* may be due to the presence of favourable conditions throughout the process (temperature, salinity and agitation).

References

- [1] Helm, R. R. (2018). Evolution and development of scyphozoan jellyfish. *Biological Reviews*, 93, 1228–1250.
- [2] Moraes Z, Schiariti A & Morandini A. In: Jellyfish, Ecology, Distribution Patterns and Human Interactions. New York: Nova Science Publishers; 2017. p. 91-145.
- [3] Ohtsu, K., Kawahara, M., Ikeda, H., & Uye, S. I. (2007). Experimental induction of gonadal maturation and spawning in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology*, 152(3), 667-676.
- [4] Schiariti, A., Kawahara, M., Uye, S., & Mianzan, H. W. (2008). Life cycle of the jellyfish *Lychnorhiza lucerna* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology*, 156(1), 1-12.

Acknowledgements: This study was funded by Egas Moniz Coop Ensino Superior CRL, project EM-ZM 03/04.